

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA.
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD
ANTAGÓNICA CONTRA *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) EN
EL CULTIVO DE FRIJOL**

PRESENTADO POR:

MARIA GISELLE PINZÓN DE LISAC
NICANOR ALEJANDRO VERGARA VÁSQUEZ.

**REQUISITO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

PANAMÁ, REP.DE PANAMÁ

2019

COMITÉ ASESOR:

Profesor principal: Prof. Dr. Rito Herrera

Facultad de Ciencias Naturales, Exacta y Tecnología.

Escuela de Biología.

Departamento de Genética y Biología Molecular.

Profesor: Prof. Fermín Mejía, M.Sc.

Facultad de Ciencias, Exactas y Tecnología.

Escuela de Biología.

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Profesora: Prof. Dalila Montañez, Dra.

Facultad de Ciencias Naturales Exactas y

Tecnología.

Escuela de Biología.

Departamento de Microbiología y Parasitología.

DEDICATORIA

“El temor de Jehová es el principio de la sabiduría”

Proverbios 9:10.

Exaltando al todo poderoso quien ha permitido concluir este trabajo investigativo, quiero empezar agradeciendo especialmente a las personas que estuvieron animándome, apoyándome, cuando las cosas se ponían difíciles.

Gracias a mi querida madre, Leticia Vásquez, a mi padre Javier Vergara y mi hermana Sarah Vergara por soportarme, comprenderme y acompañarme en este camino que escogí; son parte fundamental en este proyecto que culmina. Bendecido y en victoria a ustedes les doy las gracias totales.

Nicanor Vergara.

DEDICATORIA

A Dios sobre todas las cosas, por permitirnos terminar con éxito nuestro trabajo de investigación sin él nada de esto fuera posible, que sea a él todo el honor y la honra. Al apoyo infinito de mi mamá Dalila Vargas y mi papá Salvador Pinzón siempre siendo mi norte y mi mayor motivación, a mi hermano José Pinzón por su apoyo. A mi esposo Eric Lisac por darme siempre las fuerzas necesarias para seguir hasta el final y no rendirme.

Gracias a toda mi familia que de una u otra forma lograron llenarme de fuerzas, cuando más los necesitaba. Quiero también agradecerles a todos mis amigos y compañeros que siempre creyeron en mí y en especial a los que siempre me brindaron su ayuda y comprensión.

María G. Pinzón V.

AGRADECIMIENTO

Gracias infinitas a la Universidad de Panamá por darnos la oportunidad de superarnos al permitirnos estudiar en esta prestigiosa casa de estudio. Los laboratorios LAMEXA y laboratorio de microbiología de IDIAP Rio Hato donde se realizó la parte experimental de presente trabajo de Pregrado.

Queremos expresar agradecimiento al Dr. Rito Herrera por conseguir esta oportunidad de realizar esta investigación con el IDIAP, a la Dra. Dalila Montañez por sus acertados consejos, por entender nuestros problemas e interesarse en ellos, por ser la gran persona que es, al Magister Fermín Mejía por su valiosa colaboración y al Dr. Ariel Magallón, porque sin conocernos ofreció su ayuda profesional sin nada a cambio. Expresar nuestro agradecimiento especial al Dr. José Yau, por ayuda desinteresada.

Además también agradecer a personas que de una u otra forma estuvieron pendiente durante este trabajo, al M.Sc Humberto Cornejo por los consejos e interés, a la Licda. Yaraviz De Gracia por su apoyo en el laboratorio, a todas las personas que laboran en el IDIAP de Rio Hato por su buen trato, por estar allí en los tiempos difíciles, Sra. Sara y la Ingeniera Kelia, Ingeniero José Causadías. Y un especial agradecimiento para el Sr. Silvino Sánchez por prestarnos su finca agroecológica para trabajar esta investigación.

ÍNDICE GENERAL.

DEDICATORIA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGREDECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	ix
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCION.....	1
I. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
1.1 Control biológico.....	4
1.2 Mecanismos de acción de Antagonismos.....	5
1.2.1 Competencia.....	5
1.2.2 Antagonismo.....	5
1.2.3 Fungistasis.....	6
1.2.4 Antibiosis.....	6
1.2.5 Micoparasitismo.....	7
1.3 Granos básicos.....	7
1.3.1 <i>Phaseolus vulgaris</i>, frijol común.....	8
1.3.2 Clasificación taxonómica del frijol.....	9
1.3.3 Distribución y descripción morfológica.....	9
1.4.1 Morfología.....	10
1.4.2 Importancia y Valor nutritivo del <i>Phaseolus vulgaris</i>.....	11
1.4.3 Producción mundial de frijol –poroto.....	12
1.4.4 Frijol– poroto en Panamá.....	13

1.5	<i>Thanatephorus cucumeris</i> fitopatógeno.....	16
1.5.1	<i>Rhizoctonia solani</i>	17
1.5.2	Biología de <i>Rhizoctonia solani</i>	19
1.6	Síntomas de la mustia hilachosa.....	20
1.6.1	Mustia Hilachosa en Panamá.....	21
1.6.2	Manejo de la mustia hilachosa en panamá.....	21
1.6.3	Ciclo Biológico de <i>Thanatephorus cucumeris</i> plantas de frijol.....	22
1.6.4	Biocontrol de <i>Thanatephorus cucumeris</i>	23
II.	METODOLOGÍA.....	25
2.0	Localización geográfica.....	26
2.1	Recolección de la muestra.....	27
2.2	Preparación de los medios de cultivo.....	27
2.3	Respiración microbiana.....	27
2.4	Actividad deshidrogenasa.....	29
2.5	Determinación de bacterias y hongos epífitos.....	29
2.5.1	Determinación de bacterias y hongos endófito.....	30
2.5.2	Determinación de bacterias y hongos de la rizosfera.....	31
2.6	Tubos inclinados (preservación a corto plazo).....	31
2.7	Pruebas antagónicas (cultivo dual).....	32
2.7.1	Índice de inhibición de pruebas antagónicas.....	33
2.8	Pruebas api 20E.....	34
2.8	Caracterización de morfotipos (microcultivo).....	35
2.9.1	Preservación de microorganismos en glicerol.....	36
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1	Respiración microbiana en los suelos de la planta de frijol en sus tres estados fenológicos.....	38
3.2	Actividad deshidrogenasa en los suelos de las plantas de frijol en sus tres estados fenológicos.....	39
3.3	Valoración del número de aislamientos totales y total de microorganismo positivos en actividad antagónica.....	39

3.3.1 Valoración del número de aislamientos por etapa fenológica en organismos epífitos.....	40
3.3.2 Valoración del número de aislamientos por etapa fenológica en organismos endófitos.....	42
3.4 Valoración del número de aislamientos por etapa fenológica en organismos de la rizosfera.....	44
3.5 Prueba antagónica de las bacterias contra <i>Rhizoctonia solani</i> (bacterias).....	45
3.6 Pruebas antagónicas. Porcentaje inhibición de los enfrentamientos antagónicas entre hongos aislados y el patógeno (<i>Thanatephorus cucumeris</i>).....	49
3.7 Resultados de las pruebas api 20E y microcultivo	50
IV DISCUSIONES.....	53
V CONCLUSIONES.....	60
VI RECOMENDACIONES.....	62
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64
VIII ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla N° 1. Composición del frijol en 100g de porción comestible.....	12
Tabla N°2. Descripción de las principales variedades de frijol poroto (<i>Phaseolus vulgaris</i>) utilizadas en Panamá	15
Tabla N°3. Anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i> y las enfermedades que causan en diferentes especies de plantas cultivadas.....	18
Tabla N°4. Tecnología del IDIAP para el manejo integrado de la mustia hilachosa.....	22
Tabla N°5. Bacterias positivas en actividad antagónica (enfrentamientos días 1 y 7).	48

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura N°1. Localización geográfica de la Finca Experimental Nueva Esperanza (provincia de Coclé).	26
Figura N°2: Esquema de preservación de bacterias en tubos inclinados.....	32
Figura N°3. Pruebas antagónicas (cultivo dual).....	33
Figura N°4: Valores de la respiración en cada etapa fenológica de las plantas de frijol.....	38
Figura N°5. Valores de la actividad deshidrogenasa en los suelos de la plantas de frijol en sus tres fase fenológicas.....	39
Figura N°6. Relación entre el número total de aislamientos y los microorganismos con actividad antagónica.....	40
Figura 7. Valores de aislamiento por diluciones en los tres estados fenológicos, organismos epífitos (bacterias).....	41
Figura 8. Número de aislamiento por diluciones en las diferentes fases fenológicas, organismos epífitos (hongos).....	42
Figura 9. Aislamiento por fase fenológica de la parte endófito de la filósfera (bacterias).....	43
Figura 10. Aislamiento por fase fenológica de la parte endófito de la filósfera (hongos).....	43
Figura 11. Aislamientos por dilución, fase fenológica, sección de la rizósfera (bacterias).....	44
Figura 12. Aislamientos fúngicos por sección de la rizosfera y número de aislamientos (hongos).....	45
Figura 13. Porcentaje de inhibición de las bacterias aisladas (PIR 46 %).....	46
Figura 14. Bacterias positivas en antagonismo por fase fenológica.....	46
Figura 15. Porcentaje de inhibición de los hongos aislados frente a <i>Thanatephotus cucumeris</i>	49
Figura 16. Pruebas positivas en antagónicas de A) AEFR(3)P4A, B) MEFR(3)PCB, C) BEV5 Y D) BEV17 (séptimo día de medición).....	50
Figura 17. Pruebas Api 20E para organismos Gram negativos.....	50
Figura 18. Observaciones microscópicas de <i>Colletotrichum</i> e <i>Aspergillus</i> , obtenida de la técnica de microcultivo (objetivo de 100x).....	51
Figura 19. Observaciones microscópicas de los géneros <i>Aspergillus</i> (BEV17) y <i>Penicillium</i> (BEV5), técnica microcultivo (objetivo de 100x).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS.

- $A_{485\text{nm}}$: lectura de absorbancia a 485 nanómetros.
- ADH: deshidrogenasa.
- ANOVA: análisis de varianza.
- BaCl_2 : cloruro de bario anhidro.
- CIT: citrato.
- CO_2 : dióxido de carbono.
- EnFl: endófito floración.
- EnFR: endófito fructificación.
- Env: endófito vegetativo.
- EPFL: epifito floración.
- EPFR: epifito fructificación.
- EPV: epifito vegetativo.
- FAO: Food and Agriculture Organization.
- g: gramos
- GEL: gelatinasa.
- H_2S : producción de H_2S .
- HCl: ácido clorhídrico.
- Sc: sin crecimiento.
- IDIAP: Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.
- IND: producción de indol.

- LAMEXA: laboratorios de microbiología experimental aplicada.
- LDC: lisina descarboxilasa.
- MF: madurez fisiológica
- MIDA: Ministerio de Desarrollo Agropecuario.
- ml: mililitros.
- NaCl: cloruro de sodio.
- NaOH: Hidróxido de sodio.
- ODC: ornitina descarboxilasa.
- ONPG: beta-galactosidasa.
- PDA: agar papa dextrosa.
- PIR: porcentaje de inhibición radial.
- RFL: raíz floración.
- RV: raíz vegetativo.
- TDA: triptófano desaminasa.
- TFL: suelo floración.
- TRFL: suelo+raíz floración.
- TRV: suelo+ raíz vegetativo.
- TSA: agar trypticasa y soya.
- TV: tierra vegetativo.
- UFC: unidad formadora de colonia.
- URE: ureasa.
- VP: producción de acetoina.

RESUMEN.

La presente investigación se realizó en Río Hato, provincia de Coclé, durante los años de 2017 y 2018, con el objetivo de aislar e identificar microorganismos con actividad antagonista contra el patógeno fúngico *Thanetophora cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), para intentar minimizar el uso de fungicidas y otros compuestos químicos utilizados en el control convencional de este hongo. Este patógeno es el agente causal de la enfermedad denominada mustia hilachosa, la cual ataca hojas, tallos y vainas. En las hojas aparecen pequeñas manchas de aspecto acuoso y color café claro, rodeadas de borde oscuro. Las manchas crecen, se unen y forman manchas más grandes, más oscuras, con fino borde oscuro. En estas manchas aparecen pequeños hilos blancos o café claro, que pegan las hojas entre sí (parece una telaraña). En la temporada de lluvias se ven muchos pequeños granitos café claro (esclerocios) alrededor de las manchas. En vainas causa lesiones oscuras y acuosas evitando así el desarrollo de las plantas.

Se aislaron un total de 185 bacterias y 72 hongos a partir de plantas de frijol en sus tres estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación), en rizosfera y filósfera. Se realizaron pruebas antagónicas contra el patógeno fúngico *Thanetophora cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), determinándose el porcentaje de inhibición radial.

De acuerdo al análisis estadístico (ANOVA) se determinó que hubo diferencias significativas entre las diluciones utilizadas en las bacterias, siendo la dilución de 10^{-4} donde se aislaron mayor cantidad de bacterias. En los microorganismos epífitos hubo diferencias significativas en las diluciones, siendo la dilución 10^{-4} donde más bacterias se aislaron, no hubo diferencias entre las fases fenológicas. En cuanto los microorganismos endófitos (bacterias) el análisis estadístico indicó que la fase fenológica es significativa, siendo la fase vegetativa de la cual más aislamientos se obtuvo, el análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas por sección de la filósfera.

En la sección de la rizosfera el análisis estadístico indicó diferencias significativas en las diluciones, siendo la dilución de 10^{-2} donde se aisló mayor cantidad de bacterias.

En cuanto a los hongos la sección epífita, no hubo diferencias significativas entre las diluciones ni en la fase fenológica. En la sección endófito hubo una diferencia significativa en las fases fenológicas, siendo la fase de fructificación donde se presentó mayor aislamiento fúngico. La rizosfera presentó diferencias significativas en las diluciones, siendo 10^{-4} donde más aislamientos fúngicos se obtuvo. En relación a la actividad antagonista contra *Thanatephorus cucumeris*, se lograron aislar 8 bacterias y 4 hongos, los cuales pertenecen a los géneros *Pseudomonas* (bacterias) y los hongos positivos pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum*.

INTRODUCCIÓN.

El aumento drástico de la población durante los últimos dos milenios, ha provocado una alta demanda de alimentos. La agricultura aporta gran parte de los víveres consumidos, esto obligó al hombre a crear métodos para incrementar la producción agrícola y obtener rápidas cosechas con buen rendimiento.

La extensión agrícola se ha difundido por el mundo ya que ningún país puede dejar de lado por mucho tiempo a su población campesina. Es así que en casi todos los países existe uno u otro servicio de extensión y consulta agrícola (FAO, 2014)

La agricultura convencional de actualidad produce cerca del 20% de la emisión de gases invernaderos (FAO, 2014). Estas actividades agrícolas extensivas y la ampliación de sus fronteras ha traído consigo serios problemas fitosanitarios en los sistemas naturales.

Uno de los aspectos importantes en la agricultura, es el control de plagas y enfermedades; utilizando medidas de control biológico, se minimiza el uso de plaguicidas y otros compuestos químicos que tienen un efecto nocivo en la salud, y el ambiente en general. Las bacterias, los hongos y otros microorganismos pueden competir por nutrientes y espacios contra los organismos patógenos, siendo de utilidad en el control de los mismos, con el consiguiente impacto económico positivo en las actividades agrícolas.

Cuando esto pasa, las plantas no son atacadas por plagas o enfermedades, o se ven afectadas en un menor grado. Este tipo de control de plagas no es visible. Algunos ejemplos de los microbios más utilizados son *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* (González *et al.*, 1998). El empleo de agentes de control biológico (BCAs) ha permitido una reducción en el uso de plaguicidas y por lo tanto un control más eficiente de los fitopatógeno.

El Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), intenta aislar microorganismos beneficiosos que minimicen el uso de plaguicidas para el control de patógenos en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*), ya que esta leguminosa es

un componente esencial en la dieta sobre todo en Mesoamérica y Sudamérica por sus numerosas variedades nutricionales de las proteínas en las semillas (Gepts *et al.*, 1986).

En Panamá, el rendimiento de este cultivo es bajo debido principalmente al ataque de plagas y enfermedades, lo que ha ocasionado un aumento en la aplicación de plaguicidas elevando los costos en la producción de este cultivo (MIDA, 2012).

Entre los principales problemas para el cultivo de este grano esta: la mala germinación, ataque de insectos, competencia de malezas, ataque de animales, falta de nutrientes, falta de agua y hongos del suelo ya que en Panamá se dan las condiciones favorables para el desarrollo de los mismos.

En este contexto, el presente trabajo evaluó bajo condiciones *in vitro*, la capacidad antagónica de los hongos y bacterias aisladas de las plantas de frijol en sus tres estados fenológicos (vegetativo, fructificación y floración), frente al hongo fitopatógeno *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (*Rhizoctonia solani* Kühn).

CAPÍTULO I
REVISIÓN DE LA LITERATURA.

1.1 Control biológico

Control biológico fue originalmente definido como "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (DeBach, 1977). Este fue concebido a inicios del siglo XIX cuando algunos naturistas de diferentes países, reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza y con el empleo de estos controladores y con estos se intentaba restablecer el perturbado equilibrio ecológico, el control biológico como método científico es relativamente moderno, ya que tiene una edad de un poco más de 100 años (Badii, *et al.*, 2000).

En la actualidad se entiende como biocontrol la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar (Ezzi *et al.*, 2006).

El control biológico de enfermedades en plantas con agentes microbianos es una posibilidad atractiva, tomando en cuenta que el costo de esta, respecto a los métodos tradicionales pueden ser menores y con una mayor eficiencia. De modo que aunque los microorganismos antagonistas pueden actuar en forma más lenta y en menor escala, su acción puede ser más estable y duradera que el control químico (Lewis *et al.*, 1984).

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (De Costa *et al.*, 2005; Wisniewski *et al.*, 1992). También se ha reportado que la superficie de las hojas (filoplano) constituye otra fuente para el aislamiento de antagonistas (Zhou *et al.*, 1999). Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características:

generales: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y de persistir en ellas de manera efectiva, b) mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes, y c) capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Wisniewski *et al.*, 1992).

1.2 Mecanismos de acción de Antagonismos.

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

1.2.1 competencia.

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren la misma cosa y el uso por uno reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia puede ser por los sitios de infección, donde la ocupación de dichos sitios por un microorganismo impide la colonización por otro o bien por determinados nutrientes. En la competencia por nutrientes o bien un microorganismo posee un mecanismo de absorción mejor o posee enzimas extracelulares más activos, de forma que uno obtiene más nutrientes y crece, mientras que el otro no obtiene nutrientes suficientes para crecer. Este mecanismo está demostrado en cuanto a las fuentes de carbono y de nitrógeno, y también es posible para otros requerimientos como oxígeno, hierro y en el caso de autótrofos por la luz (Rubio *et al.*, 2008).

1.2 .2 Antagonismo

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista. Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógeno el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en la rizosfera, los antagonistas producen antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

1.2.3 Fungistasis

Los organismos antagonistas realmente buenos son capaces de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otra especie, y sobrevive bajo condiciones adversas (Benítez, 2004).

Generalmente, se emplea limitación en las fuentes de carbono. Muchos patógenos producen estructuras de supervivencia que se encuentran en el suelo a la espera de que exista una fuente de nutrientes para desarrollar las formas activas del microorganismo. Los elementos saprótrofos pueden reducir las fuentes de carbono e imponer la fungistasis a las esporas del patógeno impidiendo que germinen y que infecten a las plantas. La disponibilidad de carbono en forma asimilable permite la germinación de esporas y la adición de materia orgánica en forma de compost o similares estimula la actividad microbiana de los saprótrofos, de forma que se origina una intensa competencia, pudiendo producir limitación de carbono para las esporas y fungistasis (Rubio *et al.*, 2008). Hay microorganismos que crecen rápidamente cuando se inoculan en el suelo, ya que son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas tales como DDT, y compuestos fenólicos (Chet, 2003).

1.2.4 Antibiosis.

La antibiosis se considera como uno de los principales mecanismos de biocontrol que tiene como base la producción de metabolitos tipo antibióticos. Estos se definen como un grupo químicamente heterogéneo y de bajo peso molecular, secretados por algunos microorganismos que, en bajas concentraciones, demeritan el crecimiento o actividades metabólicas de otros organismos (Méndez, 2003)

La lisis celular debida a enzimas o metabolitos de otros organismos (exolisis) se puede producir por la producción por parte de un microorganismo competidor de antibióticos, que normalmente actúan a muy bajas concentraciones. Los antibióticos son el mecanismo más estudiado de antagonismo entre microorganismos dada su importancia en medicina. La mayoría de los antibióticos han sido aislados de microorganismos del suelo, aunque también se han encontrado en

microorganismos que viven en las hojas o en otras partes de las plantas. Parece obvio que los antibióticos deben de jugar un papel en el medio ambiente, aunque este punto todavía no se ha demostrado satisfactoriamente (Rubio *et al.*, 2008). El efecto de antibiosis *in vitro* se puede apreciar macroscópicamente por el halo de inhibición que se crea alrededor de una colonia en la cual no confluye el crecimiento de un microorganismo cercano en la placa de cultivo (Waksman, 1944).

1.2.5 Micoparasitismo.

Es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanasa y proteasas, que lisan (rompen) las paredes de las hifas, o esclerocios de hongos parasitados (Orietta *et al.*, 2001; Méndez, 2003).

1.3 Granos básicos

En Panamá y el resto de Latinoamérica, dentro de los granos básicos, el frijol (*Phaseolus vulgaris*), es uno de los más importantes por el aporte de proteínas. La producción promedio mundial en el año 2005 fue de 19,19 millones de toneladas (FAO, 2014). El hongo *Thanatephorus cucumeris* y su estado asexual *Rhizoctonia solani*, provoca la enfermedad conocida como mustia hilachosa. Dicha enfermedad representa una limitante en el cultivo de frijol común, *Phaseolus vulgaris* L (Gálvez *et al.*, 1994). Se presenta en terrenos infectados con períodos prolongados de lluvias, temperatura y humedad relativa promedio de 24° C y 80% respectivamente (Acosta, 1989).

El manejo de esta enfermedad con los métodos tradicionales, variedades resistentes y control químico no han dado resultados positivos. Esta enfermedad es considerada como la más destructiva del frijol, por la defoliación rápida y drástica que causa (Gálvez, *et al.*, 1982). En condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, puede causar una destrucción rápida de las plantas atacadas en una

o dos semanas y pérdidas en el rendimiento de hasta 50% (Rodríguez *et al.*, 1997, Rodríguez *et al.*, 1999).

1.3.1 *Phaseolus vulgaris*, frijol común.

El frijol es de origen americano. Los restos más antiguos de esta planta, ya domesticada, se encontraron en las cuevas de Coxcatlán, en el valle de Tehuacan Puebla y datan de hace 4975 años AC. Debido a la gran variedad arqueológica de *P. vulgaris* y tal vez a su grado de endemismo, se ha sugerido una domesticación múltiple dentro de Mesoamérica a partir de una especie ancestral, la cual era polimórfica y estaba ampliamente distribuida (INIFAP, 2005).

Solo *P. vulgaris* ocupa más del 85 % de la superficie mundial dedicada a este cultivo (INIFAP, 2005). Se trata de una especie originaria de la región mesoamericana (México, América Central) pero con un importante centro de dispersión en Perú, Ecuador y Bolivia. *P. vulgaris* fue llevada de América a Europa por los españoles en el siglo XVI. Está muy distribuida en distintas partes del trópico, subtropical y regiones templadas, siendo la legumbre más importante en Latino América y parte de África. La Península Ibérica puede ser considerada como un centro secundario de diversificación de esta especie, ya que han sido cultivadas durante centurias en distintos agro ecosistemas (Pinheiro *et al.*, 2007).

Según datos del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA, 2012), la producción mundial por continente del frijol es, Asia con un 50% de la producción mundial, los países con mayor producción de este continente son China, Myanmar y la India. América produce el 35%, los principales productores de frijoles en América son: Brasil, México, Estados Unidos, Canadá y Argentina. África por su parte produce el 12%, y cuyos principales productores son: Uganda, Ruanda y Tanzania. Europa solo produce el 3% de la producción mundial de frijol, Ucrania, Bielorrusia y Polonia son los principales productores europeos.

1.3.2 Clasificación taxonómica del frijol

Clasificación taxonómica, según Linneo (1753), el sistema de nomenclatura binominal, el nombre completo del frijol común es *Phaseolus vulgaris* L.

(Chazan, 2008) establece la siguiente clasificación taxonómica del frijol

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Subfamilia: *Faboideae*

Tribu: *Phaseoleae*

Subtribu: *Phaseolinae*

Género: *Phaseolus*

Sección: *P. sect. Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris*

1.4 Distribución y descripción morfológica.

El frijol común es una variedad que se cultiva en gran diversidad, en climas entre los 0 a 3000 msnm y sus mayores rendimientos se obtienen en zonas donde la temperatura promedio oscila entre los 15 y 27 °C. Este grano se produce en regiones con precipitaciones anuales de entre 1500 a 2600 mm, aunque en lugares con 300 y 400 mm de precipitaciones anuales bien distribuidos son suficientes para obtener una buena cosecha. Un exceso o déficit de lluvia si afecta directamente a

la producción, ya que inciden directamente en el desarrollo de la planta y susceptibilidad a enfermedades (Broughton *et al.*, 2003).

1.4.1 Morfología

Es una planta herbácea, trepadora, de ciclo anual, que se cultiva tanto en zonas tropicales como templadas. Ciertas veces cubierto por vellosidades, tienen tallos y zarcillos volubles (Beaver *et al.*, 2002).

Los frijoles tienen raíces fibrosas, son poco profundas y está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación que se desarrollan en la parte superior o cuello de la raíz principal. Producen su propio nitrógeno en el suelo cuando se exponen a las bacterias fijadoras de nitrógeno. El nitrógeno es el nutriente primario necesario para cultivar las plantas de frijol, de modo que la capacidad de las raíces para hacer esto ayuda a garantizar la salud de la planta a medida que madura (Gepts *et al.*, 1990).

Las hojas trifoliadas presentan además un pecíolo y un raquis; en la base del pecíolo, y muy próximo al tallo, está el pulvínulo, estructura que se relaciona con los movimientos nictinásticos de las hojas. A cada lado del punto de inserción de las hojas trifoliadas, se presenta una pequeña estípula de forma triangular.

Los tres folíolos de cada hoja compuesta, uno central y dos laterales, son simétricos y acuminados; cada uno de los folíolos presenta un peciólulo que los une al raquis, observándose además la presencia de una estipela en cada folíolo lateral, y de dos estipelas en el folíolo terminal; estas estructuras se ubican en la base de los peciólulos (Gepts *et al.*, 1990; Vivanco *et al.*, 2011).

En cuanto al tallo principal es herbáceo, se desarrolla en forma de hierba voluble, de cierta manera crece en espiral alrededor de un soporte, o puede ser rastroso en cuyo caso se extiende por el suelo y sus rizomas corren en posición horizontal, es una sucesión de nudos y entrenudos donde se insertan las hojas y los diversos Revisión Bibliográfica 6 complejos axilares, el tallo o eje principal es de mayor diámetro que las ramas laterales. El tallo puede ser erecto, semipostrado o postrado, según el hábito de crecimiento de la variedad; pero en general, el tallo

tiende a ser vertical ya sea que el frijol crezca solo o con algún soporte. Las de hábito de crecimiento indeterminado siguen creciendo durante la etapa de floración, aunque a un ritmo bien lento y las de crecimiento postrado indeterminado pueden alcanzar alturas superiores de 80 cm.

Presenta flor de dos tipos: simples y compuestas. Posee flores papilionáceas con 10 estambres y un ovario con un estilo largo en espiral y un estigma peludo; el estigma está situado lateralmente a lo largo del arco interno del estilo curvado, donde intercepta el polen de sus propias anteras.

El fruto es una legumbre lineal, cilíndrica, polisperma, bivalva y dehiscente, de color variable con 3-12 semillas en su interior. Las semillas son reniformes o subcilíndricas, con germinación epigea o hipogea (Gepts *et al.*, 2005).

1.4.2 Importancia y Valor nutritivo del *Phaseolus vulgaris*.

Los frijoles tienen una importante fuente de energía, carbohidratos y proteínas. Es de gran importancia en la nutrición humana. Sin embargo, el valor biológico de las proteínas del frijol es inferior en comparación con las proteínas de origen animal como el huevo o la leche. En cuanto al contenido de vitaminas y minerales destacan los siguientes: folatos, hierro, fósforo, magnesio y niacina. En cuanto a su contenido en fotoquímicos destaca el ácido fítico y fenoles (INCAP, 2007).

Los frijoles tienen un mayor porcentaje de hidratos de carbono la principal es el almidón. En cuanto a las proteínas, su contenido es alrededor del 20%, lo que representa el doble de lo que encontramos en los cereales. La proteína es rica en aminoácidos esenciales como lisina, baja en metionina y cisteína.

La composición de ácidos grasos de los lípidos en el frijol común, es variable, predominando la cantidad de ácidos grasos insaturados. De las vitaminas que se encuentran en los granos, las más importantes son el complejo B, especialmente la riboflavina, niacina y ácido pantoténico.

En la composición mineral de los granos, hay un mayor valor de potasio, hierro, calcio, cobre, zinc y magnesio.

Tabla 1. Composición del frijol en 100g de porción comestible

Fuente: INCAP, 2007

	Blanco	Negro	Rojo
Calorías (kcal)	333	343	337
Carbohidratos (g)	60.27	61.60	61.29
Proteínas (g)	23.36	22.70	22.53
Fibra dietética (g)	15.20	18.37	15.20
Vitamina A (mcg)	0	0	0
Vitamina C (mg)	0	1	5
Potasio (mg)	0	1464	1359
Folatos (mcg)	388	---	394
Hierro (mg)	10.44	7.10	6.69

1.4.3 Producción mundial de frijol.

El comercio de frijol en el mercado internacional es reducido en comparación con otros productos agrícolas; en general, los principales países productores destacan también como importantes consumidores (FIRA, 2015).

La producción mundial de frijol creció a una tasa promedio anual de 1.6 por ciento entre 2003 y 2014, para ubicarse en 25.1 millones de toneladas. Esta tendencia se deriva de un crecimiento promedio anual de 0.5 por ciento en la superficie cosechada y de 1.0 por ciento en el rendimiento promedio, durante el período señalado. En siete países se concentró el 63.0 % de la producción mundial de frijol en 2014: India (16.4 por ciento), Myanmar (14.9 por ciento), Brasil (13.1 por ciento), Estados Unidos (5.3 por ciento), México (5.1 por ciento), China (4.1 por ciento) y Tanzania (4.1 por ciento). Entre los principales países productores, destaca el dinamismo que la producción de frijol ha tenido entre 2003 y 2014 en Myanmar y Tanzania, donde creció a tasas promedio anuales de 6.8 y 10.8 por ciento, respectivamente. Por el contrario, en India, México y China, el volumen de

producción se redujo a una tasa promedio anual de 0.3, 0.9 y 6.1 por ciento durante el mismo período, respectivamente. En 2014, el rendimiento promedio mundial de frijol se ubicó en 0.83 toneladas por hectárea. Estados Unidos, China, Myanmar, Tanzania y Brasil reportan niveles de productividad superior al promedio mundial, mientras que los de México y la India son inferiores (FIRA, 2015).

Los principales países productores y consumidores de frijol en forma de grano seco son: Brasil (> 5,3 millones de ha) y México (1,8 millones de ha), mientras que en Colombia, Argentina y Nicaragua se siembran entre 150 y 250 000 ha (Álvarez *et al.*, 2014).

Los principales productores y consumidores de frijol en forma de grano seco son: América Latina (45%) y África (25%) y con una menor producción, América del Norte (13%), Europa (8%) y Asia (9%) (FAO, 2014).

1.4.4 Frijol – poroto en Panamá.

El frijol - poroto es uno de los granos de mayor consumo entre los panameños, su demanda se estima en 120 mil quintales anuales y su producción es de 70 mil quintales (MIDA, 2015).

Según el Ministerio de Desarrollo Agropecuario, en el año 2016 había 2,319 hectáreas cultivadas, con la aparición de 729 productores con rendimientos que oscilan entre los 25 y 30 quintales por hectárea. Las variedades de poroto más cultivadas en Panamá son IDIAP-R2, rosado, mantequilla y calima.

Las principales áreas del cultivo de poroto en Panamá son:

Áreas en pleno desarrollo: Chiriquí (San Andrés, Caizan y Río Sereno), Veraguas (San Francisco, Calobre y Santa Fe) y Herrera (Las Minas, Los Pozos y Ojú). Áreas potenciales de expansión: Coclé (El Copé y la Pintada), Capipe (San Carlos y Campana) y Los Santos (Bayano, Nuairo y Canajagua) todo esto según el MIDA, 2012.

En Panamá las importaciones de este rubro, los altos costos de producción, las plagas y enfermedades tales como la mustia hilachosa, la babosa y la falta de

fuerza laboral ponen en apuros a los productores panameños de frijoles. De acuerdo con Gerardo Escudero, representante del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura en Panamá, el crecimiento del sector no responde al dinamismo de la economía en general, y de manera particular a la estructuración agroindustrial y de las exportaciones. Cifras oficiales revelaron que el aporte del agro panameño en el Producto Interno Bruto pasó de 7,2 por ciento en el 2000 a 2,6 al cierre del tercer trimestre del año 2017.

Actualmente Chiriquí cultiva el 90 por ciento de la producción de granos del país, la cual se redujo casi a la mitad en los últimos cinco años, al pasar de cuatro mil 500 a dos mil 405 hectáreas en el periodo 2015-2016.

Reducción que también se observa en el número de productores, quienes pasaron de 900 a 760, de los cuales el 80 por ciento son pequeños agricultores que solo siembran dos hectáreas (MIDA, 2012).

En la tabla 2, podemos observar las variedades de poroto sembradas en la República de Panamá, el rendimiento de cada variedad por hectárea y el nivel de resistencia hacia la enfermedad (mustia hilachosa) que es la principal enfermedad que ataca a este rubro en el país. La semilla certificada de la variedad mejorada (IDIAP-R2 e IDIAP C1) ha sido utilizada en siembras experimentales y comerciales en el área de Caisán, San Andrés y Río Sereno, con excelentes resultados, obteniéndose rendimientos superiores a los 2,000 Kg/ha. Existen otros cultivares de frijol que han mostrado buen grado de tolerancia al patógeno en Caisán, como lo es el Talamanca que es de grano pequeño (Lorenzo, 2012).

Tabla 2. Descripción de las principales variedades de frijol poroto (*Phaseolus vulgaris*) utilizadas en Panamá.

FUENTE: Tomado de IDIAP1995 y modificado por E. Lorenzo.

VARIEDAD	COLOR DEL GRANO	DIAS A M.F1	REACCIÓN A LA MUSTIA HILACHOSA	RENDIMIENTO EN Kg/ha
Chileno	crema moteado con rojo	68	Susceptible	1,457
Rosado	Rojo	64	Susceptible	1,502
Mantequilla	Crema	64	resistencia intermedia	1,336
Calima	rojo moteado con crema	85	Susceptible	1,661
Renacimiento	crema moteado con rojo	80	Resistencia intermedia	1,587
Barriles	Rojo	68	Susceptible	1,905
Primavera	Amarillo canario	70	Susceptible	1,723
IDIAP-R2	Rosado	81	resistencia intermedia	2,385
IDIAP-C1	rojo moteado	82	resistencia intermedia	2,177
IDIAP-R3	Rojo	80	resistencia intermedia	2,485
Talamanca	Negro	80	Resistente	2,500

1.5 Hongo fitopatógico.

Según Agrios 2005, se denomina hongo fitopatógico a aquellos hongos que causan daños a las plantas. A nivel mundial originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año (National Academy of Sciences, 1980). Un mismo hongo fitopatológico puede infectar varios tipos de plantas aunque sean de diferentes

especies. Según Agrios (2005), la mayoría de los hongos fitopatógenos pasan parte de su ciclo de vida en las plantas que les sirven de hospedante, y otra parte de él en el suelo o en los residuos vegetales depositados en este sustrato. Los hongos fitopatógenos con origen en el suelo los encontramos ocasionando daño en todos los suelos de los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook y Baker, 1983). Esta capacidad adaptativa de los hongos fitopatógenos va a depender en gran medida del grado de relación que han desarrollado con sus plantas hospedantes, es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos, o saprófitos facultativos. La cantidad de estudios e investigaciones en algunos grupos depende en gran parte de la importancia económica de los cultivos o plantas que dañan.

La importancia de los hongos fitopatógenos del suelo que atacan a la raíz, no se limita solo al daño que ocasionan en las plantas hospedantes, sino debe considerarse el papel que juegan dentro de la cadena trófica y las diversas relaciones que establecen con otros microorganismos del suelo (Agrios 1998, Lumsden, 1981).

Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como el causante del deterioro patológico en una variedad de productos, siendo las especies más comunes de *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* (FHIA, 2007).

1.5.1 *Thanatephorus cucumeris*.

Hace más de 100 años, Julius Kühn observó un hongo en tubérculos de papa enfermos y lo nombró *Thanatephorus cucumeris* (Parmeter, 1970). Es un fitopatógeno común a nivel mundial, habita principalmente en el suelo, provocando la pudrición de las raíces y otros órganos subterráneos como tubérculos, en una amplia gama de hospederos. Causantes del “Mal de talluelo” en germinadores y de la muerte de arbustos y árboles de todas las edades por las infecciones provocadas

en las raíces (Sinclair *et al.*, 1987). Forma micelio color pardo claro y oscuro, conformado por hifas largas, produce ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal y se estrechan ligeramente al nivel de la bifurcación; éstas son las características morfológicas que permiten identificar el hongo (Agrios, 1996).

R. solani ocasiona pérdidas importantes en la mayoría de las plantas perennes y anuales, incluyendo los cultivos hortícolas que se desarrollan en el suelo. Causando enfermedades tales como *damping off* o caídas de las plántulas, a consecuencia del estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel del cuello en plántulas recién emergidas. Produce una reducción muy significativa en el rigor de las plantas, y la producción de tubérculos en muchos cultivos (Cedeño, 2001). En la tabla 3 observamos la enfermedad que causa *T.cucumeris* y sus respectivos hospedantes.

Tabla 3. Anastomosis de *T.cucumeris* y las enfermedades que causan en diferentes especies de plantas cultivadas (Ceresini, 1999).

Grupo de Enfermedad anastomosis	de Enfermedad	Hospedante	
AG1-1^a	Marchités de la vaina, mancha de la vaina	Arroz Maíz	
	Esclerocios, tizón de la hoja	Sorgo	
	Tizón de la hoja	Soya	
	Tizón del sur	Plántulas de alcanfor	
	Mancha marrón	Césped	
	AG1-IB	mustia	Frijol
Putrefacción		Calabaza	
Pudrición de pie		Lechuga	
AG1-IC	Ahogamiento y corona de la raíz	Soya Zanahoria	
	AG2-1	Ahogamiento	Crucíferas
Pudrición del cogollo		Fresas	
Tizón de la hoja		Tulipanes	
AG2-2 IIIB	Falso tizón de la vaina	Arroz	
	Tizón de la vaina	Maíz	
	Costra negra	Remolacha	
	Parche marrón	Pasto	
	Pudrición Ahogamiento.		
AG2-2 IV	Pudrición de la raíz y tizón de la hoja	Remolacha Pasto	
	Parche largo		
	AG 3	Costra negra y cancro del tallo/estolones "Target spot"	Papa Tabaco
Tizón de la hoja Mancha café		Tomate Berenjena	
AG 4 (HGI, HGII y HGIII)		Pudrición del fruto Pudrición del tallo	Tomate Chícharo
		Ahogamiento y cancro del tallo Ahogamiento y pudrición de la raíz Pudrición de la vaina	Papa Soya, , cacahuate

1.5.2 Biología de *Rhizoctonia solani*.

Según Agrios, 2004 *Rhizoctonia* ha sido clasificado:

Hongo superior

Subdivisión: *Deuteromycotina*

Clase: *Agonomycetes*

Orden: *Agonomycetales* (Myceliales)

Género: *Rhizoctonia*

La primera subdivisión natural de *R. solani* fue hecha por Schultz (1936), quien dividió la especie en grupos, de acuerdo a la anastomosis de hifas y cuyos estudios fueron seguidos por los estudios de Richter y Schneider (1953).

A los hongos pertenecientes a la Clase Hymenomyces se les conocía como “hongos estériles”, ya que se pensaba que eran incapaces de producir algún tipo de esporas, ya fueran sexuales o asexuales. De hecho algunas de las especies de este género producen esporas sexuales y otros conidios.

Actualmente, se sabe que *R. solani*, puede producir esporas sexuales (basidiosporas) y que su estado perfecto es *Thanatephorus cucumeris* (A.B Frank) (Cline *et al.*, 2005), este fenómeno sólo se produce bajo determinadas condiciones ambientales, como niveles de humedad y temperatura muy elevadas (Agrios, 1996). Este hongo se caracteriza por tener hifas septadas de paredes delgadas, de 57 micras de ancho, basidios en forma de barril, blancos de forma oblonga se forman sobre una capa membranosa de micelio y tiene cuatro esterigmas, cada uno de los cuales produce una basidiospora hialina, de pared delgada lisa y de forma elipsoidal (Agrios, 1996; IICA, 2004).

Es el causante de atacar a muchas plantas de interés comercial, como el frijol (IICA, 2004), En especies forestales en regiones tropicales hay numerosos daños reportados a follajes de varias especies de hevea, produciendo necrosis en la planta en forma de anillos en la lámina foliar (Zuleta, 2003; Jayasinghe, 1993; Chee y Wastie, 1980; Ferreira, 1989).

Hasta mediados de los años ochenta a clasificación de *R. solani* se basaba en características culturales, rasgos morfológicos, número de núcleos y anastomosis de las hifas (Parmerter, 1970), y hasta el momento este es el criterio más empleado para clasificar este hongo; Sin embargo, los enfoques recientes para el estudio de aislamientos de *R. solani* tienen en cuenta caracteres bioquímicos y moleculares. El microscopio electrónico de barrido también se ha utilizado para observar los detalles estructurales de las hifas y del aparato septal (Andersen, 1996; Moore, 1996).

1.6 Síntomas de la mustia hilachosa.

La enfermedad conocida como mustia hilachosa es causada por el hongo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk estado perfecto de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Dicha enfermedad representa una limitante en el cultivo de frijol común, *Phaseolus vulgaris* L. (Gálvez *et al.*, 1994). Se presenta en terrenos infectados con períodos prolongados de lluvias, temperatura y humedad relativa promedio de 24° C y 80% respectivamente (Acosta, 1989).

El manejo de la enfermedad con métodos tradicionales, variedades resistentes y control químico no han sido efectivos. En especial cuando las prácticas culturales son adecuadas y donde la distribución de inóculo en el suelo es irregular.

Se considera a la mustia hilachosa como la enfermedad más destructiva del frijol, por la defoliación rápida y drástica que causa. Ataca follaje, tallos, ramas, granos y vainas de la planta de frijol en cualquiera de sus estados fenológicos.

En condiciones favorables de alta humedad relativa (80%) y las temperaturas entre moderadas y altas (20 – 30 °C) favorecen desarrollo de la enfermedad (Agrios, 1996). La mustia hilachosa puede causar una destrucción rápida de las plantas atacadas en una o dos semanas y pérdidas en el rendimiento de hasta 50% (Rodríguez *et al.* 1997, Rodríguez *et al.* 1999)

Los primeros síntomas de la mustia hilachosa se manifiestan por medio de pequeñas manchas de consistencia acuosa en cualquier parte del follaje. Las manchas son más claras que el tejido circundante sano. Estas manchas más tarde

se tornan cafés con un borde oscuro y aumentan en tamaño. Luego coalescen hasta cubrir la superficie foliar. Bajo condiciones favorables, las hifas del hongo crecen desde los tejidos enfermos a otras partes de la planta, atándolas con grupos de hifas del micelio, como telaraña, de donde recibe el nombre la enfermedad, “Mustia Hilachosa” o “Telaraña”. Sobre los tejidos afectados se observan muchos esclerocios pequeños de color café (Pastor, 1985).

1.6.1 Mustia hilachosa en Panamá.

La mustia hilachosa en el cultivo de frijol poroto (*Phaseolus vulgaris L.*), la limitante biótica de mayor importancia en el país (Lorenzo, 1995). Es conocida por los agricultores como fuego o quemazón, puede ocasionar pérdidas hasta del 90% de la producción, ataca las hojas, Para su control, el MIDA recomienda las siguientes prácticas: Usar semilla certificada. Sembrar en lomillos de altos. Evitar siembras tupidas. Utilizar variedades de porte erecto, o de guía con maíz en relevo o asocio, rotar lotes o cultivos (tabaco, yuca, maíz, pastos). Algunas variedades son de resistencia intermedia tabla 4. Tratar semilla con benomil, carboxin, Rizolex. En ataques moderados usar fungicidas sistémicos (azoxistrobina, benomil) o protectores (carbendazim, maneb, óxido cobre).

1.6.2 Manejo de la mustia hilachosa en Panamá

En Panamá el método más utilizado, es el manejo químico para contrarrestar la enfermedad de la mustia hilachosa; Generalmente, se recomienda la aplicación foliar de químico de contacto o sistémicos para el manejo de la mustia hilachosa. Durante los años de 1994 y 1995, se evaluó el efecto de una, dos y tres aplicaciones de fungicidas en el control de la mustia hilachosa en la variedad IDIAP-R2 cuya resistencia es intermedia a esta enfermedad, y se determinó que con dos aplicaciones de benomil + clorotalonilo en dosis de 125 y 250 g i.a./ha respectivamente, se obtuvieron los rendimientos más altos (2,381 kg/ha) comparados con los rendimientos obtenidos con solo la aplicación de benomil (1,955 kg/ha) y la menor severidad de la mustia hilachosa con 20% (Lorenzo y González, 1995).

En la (tabla 4) podemos observar el manejo integrado de la mustia hilachosa en el cultivo de frijol en fincas de productores en Caisán en los años de 1996 y 1997, como resultado se obtuvieron plantaciones con menor enfermedad y rendimientos mayores y costos de producciones más bajos. La práctica de manejo integrado permite reducir los costos por quintal a B/. 34.00 en comparación con los B/. 41.00 que obtiene el productor (Lorenzo, 2012).

Tabla 4. Tecnología del IDIAP para el manejo integrado de la mustia hilachosa
(Fuente: Lorenzo, 2012).

Práctica propuesta	Descripción
Variedades	Semilla certificada de variedades mejoradas de resistencia intermedia a la mustia hilachosa: IDIAP-R2 y IDIAP-C1
Densidad	Siembras a 0.50 m entre hileras y 0.20 m entre sitios depositando dos semillas por sitio.
Fecha de siembra	Período comprendido entre el 20 de octubre y el 20 de noviembre, iniciando en los terrenos inclinados y finalizando, con los terrenos con poca inclinación.
Labranza	De conservación utilizando coberturas de rastrojos de maíz
Control químico	Dos aplicaciones de benomil + clorotalonilo en dosis de 125 y 250 g i.a./ha, respectivamente, a partir de los primeros síntomas.

1.6.3 Ciclo Biológico de *Thanatephorus cucumeris* plantas de frijol.

Según Gálvez *et al.*, 1987, este hongo está considerado como un habitante del suelo formando parte de la flora de suelos vírgenes. Persiste formando mecanismos de resistencia conocidos como esclerocios o en partes propagativas de algunas plantas. Este patógeno produce micelios, esclerocios y basidiosporas, las cuales pueden servir como fuente de inóculo.

El ciclo de *Thanatephorus cucumeris* está dividido en dos:

1. Ciclo primario: Este se inicia cuando los tejidos de la planta de frijol, son salpicados por suelo infestado de micelios o esclerocios del hongo por efecto de las lluvias, o cuando las basidiosporas son depositadas en el follaje por efecto del viento. Se pueden desarrollar hifas sobre las partículas del suelo. Al alcanzar estas el tejido del hospedante se desarrolla un cojín de infección. Las hifas penetran directamente en el tejido o a través de los estomas. La hifa continua avanzando a través de la célula o por los espacios intracelulares y en esta forma se desarrolla las primeras lesiones, las cuales generalmente aparecen primero en las hojas primarias o en las hojas trifoliadas que estén más cerca del suelo.
2. Ciclo secundario: una vez que la infección primaria ocurre, se desarrolla un gran número de esclerosis sobre el tejido infectado y en las áreas adyacentes, al igual que sobre el suelo salpicado en el tallo, las ramas y las hojas. El ciclo secundario se inicia cuando algunos de estos tejidos, cae al suelo. Nuevos esclerocios se presentan ya sea en el tejido mismo o en el suelo adyacente. Nuevamente los esclerocios son salpicados a la planta y se reinicia el proceso de infección. Los esclerocios también pueden ser diseminados por el viento u otros agentes físicos.

1.6.4 Biocontrol de *Tanatephorus cucumeris*.

Para evitar la enfermedad de la mustia hilachosa Rodríguez y Lorenzo (2009), recomiendan el manejo del patógeno mediante el uso de fungicidas sintéticos, complementarios a la siembra de variedades de resistencia intermedia. Estos en la práctica agronómica reducen el daño provocado por el patógeno (*T.cucumeris*), pero estos fungicidas químicos afectan negativamente al medio ambiente y salud humana.

Hay otras vías o alternativas de gran potencial, para el manejo de las enfermedades producidas por este patógeno, es el combate biológico, el cual se basa en la reducción de la densidad de inóculo o actividad infecciosa, por uno o más organismos antagónicos (Morales *et al.*, 2007)

Un trabajo de investigación fue realizado en Panamá, para determinar la capacidad biocontroladora de hongos y bacterias endófitos en *T.cucumeris* (Frank) Donk en condiciones de campo. Primeramente evaluaron la aplicación de (Cepa 2- Finca Margarita), *Trichoderma sp.* (Cepa 1- Colombia) y *Metarhizium anisopliae* (Colombia) en concentración de 2×10^7 conidias /ml de agua); *Bacillus subtilis* a razón de 0,335; 0,670; 1,005 y 1,340 g i. a. /l agua + Clorotalonil 36 g i.a. /ha; Benomil 50WP en dosis de 250 g i.a/ ha y el testigo absoluto. Hubo significancia ($P \leq 0,0003$) entre los tratamientos, la de menor severidad de *T. cucumeris* se dio con la adición de *Metarhizium anisopliae*, seguido de *Bacillus subtilis* con 1340 g i.a/l agua + Clorotalonil 36 g i.a/ha con 11,87% y *Bacillus subtilis* a 0335 g i.a./l agua + Clorotalonil 36 g i.a/ha con 15,0%.

Los tratamientos donde hubo mayor severidad fueron *Bacillus subtilis* 0,670 g i.a./l agua + Clorotalonil 36 g i.a/ha, *Trichoderma spp.* (Cepa 2- Finca Margarita) y el testigo absoluto con 262; 22,25% y 21,85% de severidad, respectivamente. La ecuación de regresión para el experimento $Y=2502,91-13,021*Sev$, fue significativa e indicó pérdidas de 13,02 Kg por cada uno por ciento de incremento de la enfermedad.

En el análisis marginal el tratamiento con mayor ganancia fue *Metarhizium anisopliae*, con un beneficio neto de 28,34% (Rodríguez *et al.*, 2009). La cepa de *Trichoderma spp.*, causo del 90 % a 100% la mortalidad del hongo causante de la mustia hilachosa, en frijol (poroto), cuando se aplicó en un plato Petri por pote, por uno o más antagonicos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.0 Localización geográfica

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) de la Universidad de Panamá y el Laboratorio de Microbiología Agrícola del IDIAP (Río Hato), durante los meses de marzo 2017 a abril 2018.

Se colectaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en sus tres estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación), en la Finca Orgánica Nueva Esperanza de Los Torres (Provincia de Coclé). Esta finca se caracteriza por no utilizar agroquímicos, ni abonos artificiales por más de 20 años (certificación Biolatina 2018).

El distrito de Antón está ubicado a 87 m sobre el nivel del mar, a 150 km de la ciudad de Panamá, la capital de la República y sus coordenadas geográficas son: 8° 31' 18" N y 80° 21' 33" W. La finca Las Torres (lugar de muestreo), está ubicado a una latitud de 8.56667 y longitud de -80.36667 (Figura 1).

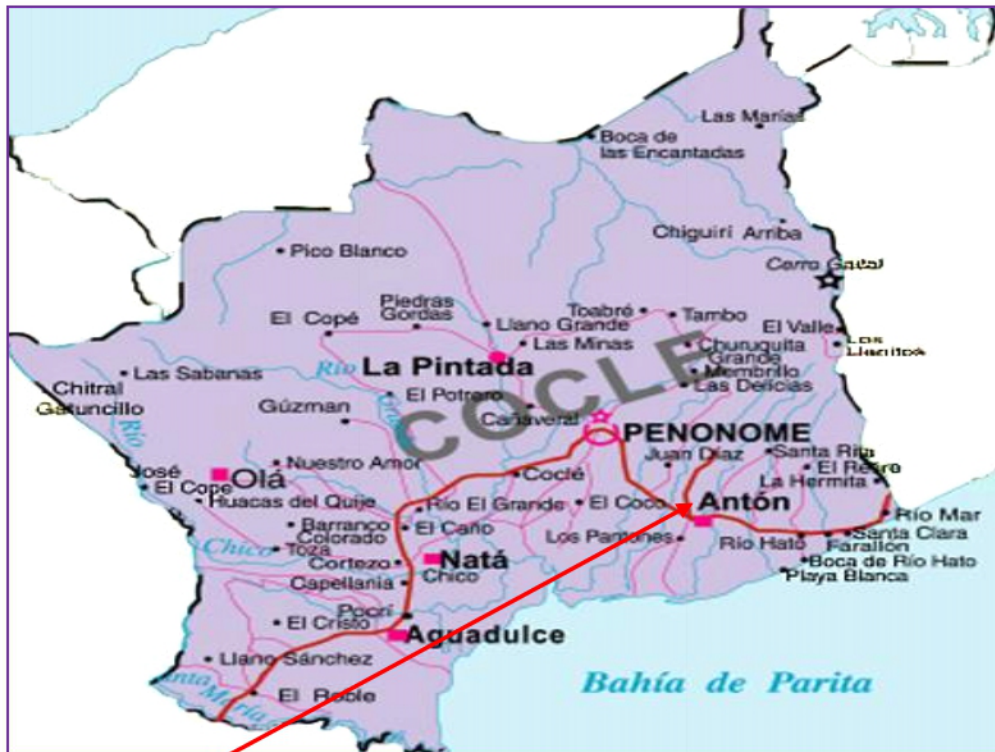


Figura 1. Localización geográfica de la Finca Experimental Nueva Esperanza (provincia de Coclé). (Google.sites, 2018).

El clima que presenta corresponde al Clima Tropical de Sabana, sujeto a sistemas atmosféricos predominantes para la vertiente central de Panamá y las condiciones climáticas regionales que moldean los regímenes pluviales de la zona. Las temperaturas oscilan entre los 25 a 27 °C, la precipitación media anual es de 3,000-2,000 mm (Contraloría de la República de Panamá, 2012).

2.1 Recolección de la muestra

Se tomaron aleatoriamente plantas de frijol en diferentes estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación) en los meses de febrero, marzo y abril de 2017 respectivamente. Las plantas se colectaron con su tallo, hojas y sistema radical, a una profundidad no mayor de 35 cm que es la profundidad, la cual alcanzan las raíces. De la misma forma, se realizaron muestreos de suelo a cada planta de frijol.

2.2 Preparación de los medios de cultivo.

Se utilizaron dos medios de cultivo, agar tripticasa y soya (bacteria) y agar papa dextrosa (hongos), preparándose según las instrucciones del fabricante (ALPHA biosciences, Inc). De las muestras de las plantas de frijol recolectadas, se determinó organismos epífitos, organismos endófitos y de la rizósfera.

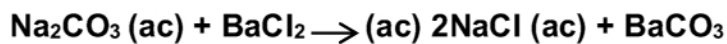
2.3 Respiración microbiana

Para esta prueba (Morillo, 2014), la muestra de suelo debe estar secada a temperatura ambiente y pulverizada evitando que tenga residuos ajenos a esta. Se procedió a hacer el montaje, el cual consiste en utilizar frascos de vidrio con boca ancha y cierre hermético, en estos se colocó 25 g de suelo; en envases plásticos más pequeños se agregó 10ml de NaOH 0.1M (captación de CO₂ y formación de Na₂CO₃ como precipitado) y 10 ml de agua destilada, estos fueron colocados dentro del frasco de vidrio y se humedeció el suelo con ayuda de un gotero. De la misma manera se montó un frasco con NaOH, pero sin suelo (control), incubándose en la oscuridad. La solución de NaOH se cambió los días 1^o, 2^o, 4^o, 7^o y 10^o de la incubación.

La solución a la cual estuvo expuesta el suelo se le valoro la concentración de CO₂ capturado. Se procedió a tomar 2ml de cada tratamiento agregándole agua destilada (1-2 ml aproximadamente) siguiendo la siguiente reacción:



Previo a la titulación, se le añadió 6 ml de BaCl₂ al 20%, para que los carbonatos que se formaron se precipitaran en forma de BaCO₃ como muestra la siguiente reacción:



Esta técnica implico calcular la cantidad de NaOH que queda sin reaccionar en el proceso de respiración (exceso), valorándolo con HCl 0.1 Ml en una bureta, utilizando además azul de timol 1% como indicador, el CO₂ emitido por el suelo se calculó como la diferencia entre el valor de titulación de un blanco sin suelo (NaOH) y el de cada muestra expuesta a la actividad microbiana (NaOH+ CO₂ (suelo)).

La cantidad de CO₂ desprendido de la mineralización se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CO}_2 = (\text{B}-\text{M}) \times \text{NHCL} \times \text{Peq} \times \text{A} \times 100 / [25(\text{ss}/\text{sh})]$$

Donde:

- ✓ CO₂= mg CO₂. 100g-l de suelo seco a 105°C
- ✓ B= volumen de HCl consumido por el blanco
- ✓ M= volumen de HCL consumido por la muestra
- ✓ NHCl = concentración o normalidad exacta del ácido clorhídrico
- ✓ Peq = peso equivalente de CO₂ emitido (44/2)
- ✓ A= Alicuola de la muestra expuesta al suelo (10/2)
- ✓ Ss/sh=relación de suelo seco a 105°C Y suelo húmedo (en gramos).

La determinación de la “cinética de la mineralización del carbono” se realizó a través de la velocidad a la que se redujo la proporción del carbono residual durante los 10

días de incubación; la cual sigue, una cinética de primer orden. De la misma manera, se calculó el coeficiente de mineralización, que es la proporción estimada de CO₂ en función del C- total del suelo (%), y el cociente metabólico o índice de CO₂ (µg. mg⁻¹ h⁻¹), o la cantidad de la actividad respiratoria en el suelo por hora (µg C- CO₂. h⁻¹) relativa al C - biomasa microbiana presente (mg C- biomasa).

2.4 Actividad deshidrogenasa.

Se utilizó el procedimiento enzimático de deshidrogenasa de Casida *et al.*, (1967). De cada suelo procedentes de las etapas fenológicas (vegetativa, floración y fructificación) de las plantas, se colocó 6g de suelo húmedo, en tubos de ensayo al cual se le agregó alrededor de 50 mg de glucosa a cada uno para acelerar el proceso de activación de los microorganismos, se añadió 2 ml de agua destilada más 1 ml de 2, 3,5- trifeniltetrazolium cloruro (TTC) al 3%.

La mezcla se homogenizó con ayuda del vórtex, hasta obtener una consistencia lodosa. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y fueron incubados en la oscuridad a 28°C por 8 días. Después de 8 días de incubación, a cada tubo se le añadió 25 ml de metanol, se homogenizó la muestra y se dejó reposar hasta que se precipitara el suelo.

Posteriormente, se filtró el sobrenadante con el sistema de filtrado al vacío; el filtrado se colocó en un matraz volumétrico de 50ml, hasta obtener un volumen de 25 ml. Para calibrar el espectrofotómetro se utilizó un blanco el cual contenía 2ml de agua, 1ml de TTC y 25 ml de etanol. Se leyó la absorbancia de cada una de las muestras a A_{485nm} y 100 nm de transmitancia.

2.5 Determinación de bacterias y hongos epífitos.

De las plantas de frijol en cada uno de los estados fenológicos, se tomaron varias hojas (10 hojas aproximadamente), las mismas fueron colocadas en un tubo de ensayo con 5 ml de agua peptonada estéril, y se agitaron vigorosamente con la ayuda de un agitador vórtex.

Posteriormente, se realizó una dilución seriada; en la cual se tomó 1 ml de la muestra del tubo madre y se diluyó en tubos con 9 ml de agua peptonada cada uno, las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Luego se tomaron 30 μ L de cada una de las diluciones y se sembraron en platos Petri con agar tripticasa y soya (TSA) para bacterias y agar papa dextrosa (PDA) para hongos, cada uno con sus respectivas réplicas, a temperatura ambiente (28 °C aproximadamente).

En el caso de las bacterias, después de 24 horas de incubación, se procedió a aislar las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/g) bacterianas. Luego se realizaron un mínimo de dos pases a cada aislamiento, seguidamente se procedió con tinción Gram para verificar la morfología bacteriana y características bioquímicas de la pared celular.

De igual forma los hongos obtenidos se aislaron, después de 42 horas de montada la muestra, realizándose dos aislamientos consecutivos cada hongo a fin de asegurar la pureza del cultivo.

2.5.1 Determinación de bacterias y hongos endófitos

Tomando en cuenta que los microorganismos endófitos se encuentran principalmente en las hojas, tallos y raíces, para el aislamiento de estos microorganismos se utilizó el procedimiento descrito por Qingmiao (2012), con modificaciones menores; se tomaron alrededor de 100 g de hojas de la planta de frijol, dividiéndolas en tres partes: ápice, base de la hoja y el centro de la misma

Se cortaron en pedazos pequeños aproximadamente de 2x2 mm, para luego pasarlas por la batería de desinfección la cual consistió de los siguientes reactivos:

- Agua destilada estéril por 5 minutos
- Alcohol al 70% por 1 minuto
- Cloro comercial al 2% por 3 minutos
- Alcohol al 70% por 30 segundos
- Alcohol al 40 % por 30 segundos

Inmediatamente los segmentos fueron colocados en papel toalla para secarlos y limpiarlos y remover el excedente líquido. Luego se sembraron nueve segmentos de cada una de las divisiones de las hojas (ápice, parte media y base) en agar TSA.

Después de 24 horas de incubación, se revisaron las muestras para determinar su crecimiento. En las muestras sembradas en TSA, las colonias bacterianas presentes fueron aisladas hasta obtener unidades formadoras de colonias (UFC) puras, verificándose estas características mediante tinción Gram. Las muestras puras se pasaron a tubos inclinados. De la misma manera los hongos obtenidos (PDA) después de 42 horas de incubación, fueron aislados y puestos en tubos inclinados.

2.5.2 Determinación de bacterias y hongos de la rizosfera.

Para el aislamiento de los microorganismos de la rizosfera se usó el método descrito por Patiño *et al.*, 2012, con modificaciones menores. Se utilizó los tratamientos: suelo, suelo +raíz y raíz. En cada uno de los tratamientos se pesaron 25 g por muestras de plantas de frijol, se diluyeron en 60 ml de agua peptonada y se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex.

Se realizó posteriormente una dilución seriada, de la cual se tomó 1 ml de la muestra del tubo madre y se procedió a diluir en tubos de ensayo con 9ml de agua peptonada cada uno. Se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}). Luego se tomaron 30 μ L de cada una de las diluciones y se sembraron en medio TSA y PDA, incubándose a 28 °C. De las muestras sembradas en TSA, se aislaron las colonias bacterianas hasta obtener unidades formadoras de colonias (UFC) puras. Igualmente los hongos fueron aislados hasta obtener microorganismos puros.

2.6. Tubos inclinados (Preservación a corto plazo).

Las bacterias y hongos aislados fueron preservados temporalmente mediante la técnica de tubo inclinado. En este caso, se colocan 5 ml de medio de cultivo fundido y estéril (PDA para hongos y TSA para bacterias) y se inclinó el tubo, luego se dejó enfriar. Posteriormente, se inoculó cada tubo inclinado de la siguiente manera:

En superficie con asa de aro bacteriológica: se picó con el asa el cultivo (bacteria) a sembrar y se esparció el mismo sobre la superficie del tubo inclinado en forma de zigzag. En profundidad con el asa de punta (hongos): se inoculó el cultivo de hongo presente en el plato Petri y luego se introdujo mediante punción en el medio contenido en la parte media del tubo inclinado (ver figura 2).

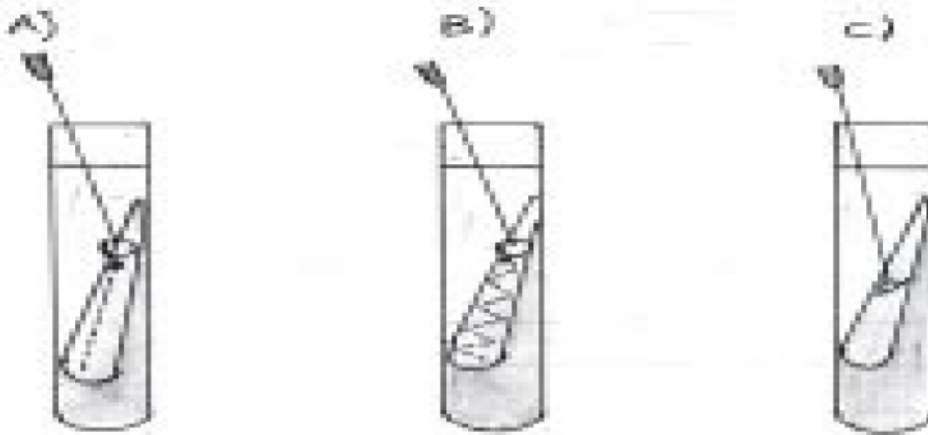


Figura 2. Esquema de preservación de bacterias en tubos inclinados. Fuente: Rangel Osorio Hugo, 2014. Manual de técnicas y métodos de preservación.

2.7. Pruebas antagónicas (cultivo dual).

Esta prueba conocida como cultivo dual, se realizó siguiendo la metodología descrita por (Meza *et al.*, 2008), con algunas modificaciones menores. Todos los hongos aislados de cada una de las partes de las plantas en sus estados fenológicos (endófitos, epífitos y rizosfera) se sembraron nuevamente en platos Petri (PDA), al igual que el hongo patógeno (*T. cucumeris*). Las bacterias se cultivaron 24 horas en caldo nutritivo y luego fueron sembradas en platos Petri con TSA (Figura 3).

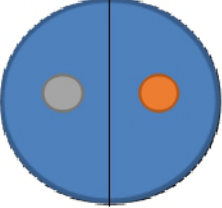
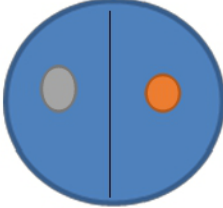
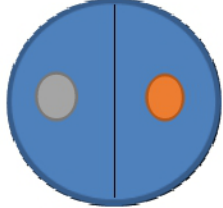
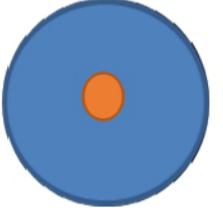
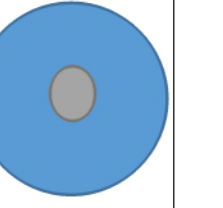
REPLICA1	REPLICA2	REPLICA 3	CONTROLES <i>T. cucumeris</i> (PDA)	CONTROL DEL HONGO AISLADO
				

Figura 3. Pruebas antagónicas (cultivo dual). Cada prueba antagónica, constará de 2 réplicas más los controles tanto del patógeno (*T.cucumeris*) como la muestra aislada.

Después de 4 días (hongos) y 24 horas (bacterias), con ayuda de un tubo de ensayo estéril (perforador) con diámetro de 5 cm (disco) se sembró el hongo o bacteria aislado a 2 cm del centro del plato Petri y en el sentido opuesto se colocó un disco de 0.5 cm a 2 cm de la línea divisora del centro del plato el hongo patógeno (*T.cucumeris*). Cada una de las muestras de hongos y bacterias aisladas poseía dos réplicas, más los controles (hongo patógeno).

La línea divisoria (centro del plato Petri) se utiliza para observar la invasión del espacio de cada microorganismo (Cundom *et al.*, 2003). Luego con la ayuda de un calibrador “pie de rey” según recomienda Suárez *et al.*, (2008), se procedió a medir los radios miceliales de los hongos los días 2, 4 y 7; En cuanto a las bacterias se les midió el radio diariamente por seis días consecutivos. Todas las pruebas antagónicas fueron incubadas a 28 °C.

2.7.1 Índice de Inhibición de pruebas antagónicas.

Después de medir el crecimiento radial de todas las muestras de las pruebas antagónicas, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyyani *et al.*, (2004):

$$\text{PIR} = (R1 - R2) / R1 \times 100.$$

Donde PIR es el porcentaje de inhibición radial (%), R1 es el diámetro del radio control (patógeno solo) y R2 es el diámetro del radio del tratamiento (patógeno + muestra aislada).

Posteriormente los hongos que presentaron evidencias de capacidad antagónica, se les aplicó la técnica de microcultivo, para identificarlos mediante una clave taxonómica, determinándose su género. Las bacterias que presentaron actividad antagónica fueron identificadas mediante el sistema API.

2.8 Pruebas Api 20E.

Para esta prueba fue utilizada la metodología presente en el manual Biomérieux api 20E. Las bacterias (puras) positivas para antagonismo (Gram -), fueron sembradas nuevamente en platos con agar nutritivo, se prepararon tubos con solución salina y se esterilizaron isopos para luego seguir el procedimiento:

1. Se Tomó una colonia bien aislada de cada microorganismo y se re-suspendió homogéneamente en los tubos con 5 mL de solución salina (1% de NaCl).
2. Con ayuda de una jeringa estéril, se procedió a llenar la cúpula de los 20 pocillos de la prueba.
3. Luego se llenó completa la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias.
4. Con aceite mineral se llenó, las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H₂S para obtener anaerobiosis.
5. La tira se puso en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente se llenó con agua los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación. Se incubó a 37° por 24 horas.
6. La lectura de los resultados se llevó a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con los de las tablas de lectura.
7. Al pocillo TDA, se añadió una gota del reactivo TDA, que contiene FeCl₃ 10 %. Al VP se le agrego una gota del reactivo VP1 que contiene KOH al 40%, luego se le agrego una gota del reactivo VP2 el cual poseía C₂ H₅

OH, al pocillo IND se le añadió una gota del reactivo James el cual contenía YU de Kovacs (1) o de Dimetilamino-cinamaldehído. se esperó por 10 minutos para esperar reacción.

8. Para la prueba de oxidasa se le agregó una gota del reactivo tetrafenilendiamina, a una colonia en el plato Petri donde se encontraba la bacteria.
9. Se anotó el resultado en la hoja de resultados del manual.
10. Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa). A cada pocillo se le da el valor 0, 1, 2 o 4.

Si la reacción es negativa se pone 0. Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero. Se suman los valores de cada triplete y se obtiene un código de 7 cifras.

2.9 Caracterización de morfotipos (Microcultivo).

De acuerdo con Arenas, 1993, el método de microcultivo es el más preciso ya que permite observar las estructuras *in situ*.

Los hongos que resultaron positivos en actividad antagónica, fueron cortados con una hoja de bisturí de la placa, con medio de PDA, en cuadrados de agar de 0,5 cm. Con la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos. Luego se sembró el hongo con la espátula en las cuatro esquinas y en el centro del bloque de agar. Colocándose el cubreobjetos sobre el bloque de agar PDA. Se generó una cámara húmeda dentro del plato Petri con el objetivo de favorecer el crecimiento del hongo y se incubó a 28 °C. Después de 7 días se desprendió el portaobjeto y se le colocó una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio (40X y 100X) para observación de estructuras reproductivas (Casa, 1989; Arenas, 2003).

2.9.1 Preservación de microorganismos en Glicerol.

La criopreservación en glicerol al 20%, es el método mediante el cual se preservó las bacterias. Las bacterias que resultaron positivas en actividad antagónica, se inocularon nuevamente en caldo nutritivo, se dejaron en el agitador por 24 horas para reactivarlas, luego de reactivarlas, con ayuda de una micropipeta con puntas estériles, y tubos de 1.5ml, se pipeteó 200µl de glicerol estéril en el tubo y luego se añadió 800µl de la suspensión de las bacteritas aireadas, seguido se homogenizo la muestra por un minuto. Y se preservó en el congelador a -80°C.

En cuanto a los hongos puros que permanecían en tubos inclinados, nuevamente se puso a crecer en platos Petri de los pequeños, por ocho días. En un tubo esterilizado previamente se le agregó 300 µl de glicerol estéril con ayuda de una micropipeta. Al plato Petri donde se encontraba el hongo se le agrego 1400 µL de agua estéril, luego se tomó 700 µl de la suspensión de esporas de esta muestra y se añadió al tubo que contenía los 300 µl de glicerol, para homogenizarlo un minuto en el vórtex, luego se congelado a temperatura de -80°C.

CAPÍTULO III
RESULTADOS

3.0 RESULTADOS

3.1. Respiración microbiana en los suelos de las plantas de frijol en sus tres estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación).

Los resultados obtenidos de la respiración microbiana ($\text{mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) en los suelos de las distintas fases fenológicas de la planta de frijol se pueden observar en la Figura. 4.

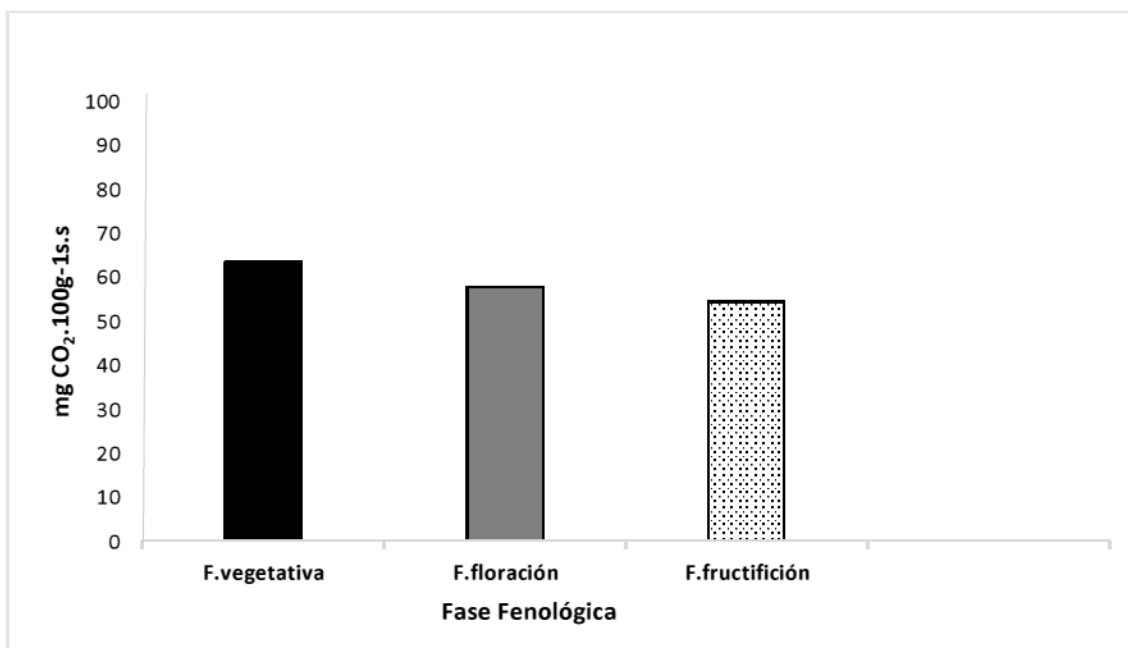


Figura 4: Valores de la respiración en cada etapa fenológica de las plantas de frijol.

El suelo con la mayor tasa de respiración resultó ser el de la fase fenológica vegetativa, mostrando una tasa de producción de CO_2 de $63.36 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, mientras que el suelo de la fase de floración presentó una tasa de respiración de $58.7 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; Y la fase fenológica de fructificación presentó una tasa de $54.53 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

3.2 Actividad deshidrogenasa en los suelos de las plantas de frijol en sus tres estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación).

El ensayo realizado, para evaluar el efecto de la actividad de la enzima deshidrogenasa en las muestras de suelo de cada uno de los estados fenológicos de la planta de frijol dio como resultado:

El suelo de la planta en fase fenológica vegetativa, presentó una absorbancia de 0.480 (A_{485nm}) con 16% de humedad, mientras el suelo en fase fenológica de floración obtuvo una absorbancia de 0.905 (A_{485nm}) y por último el suelo de la planta en fase fenológica de fructificación obtuvo una absorbancia de 0.784 (A_{485nm}), con humedad superior al 17% (Figura.5).

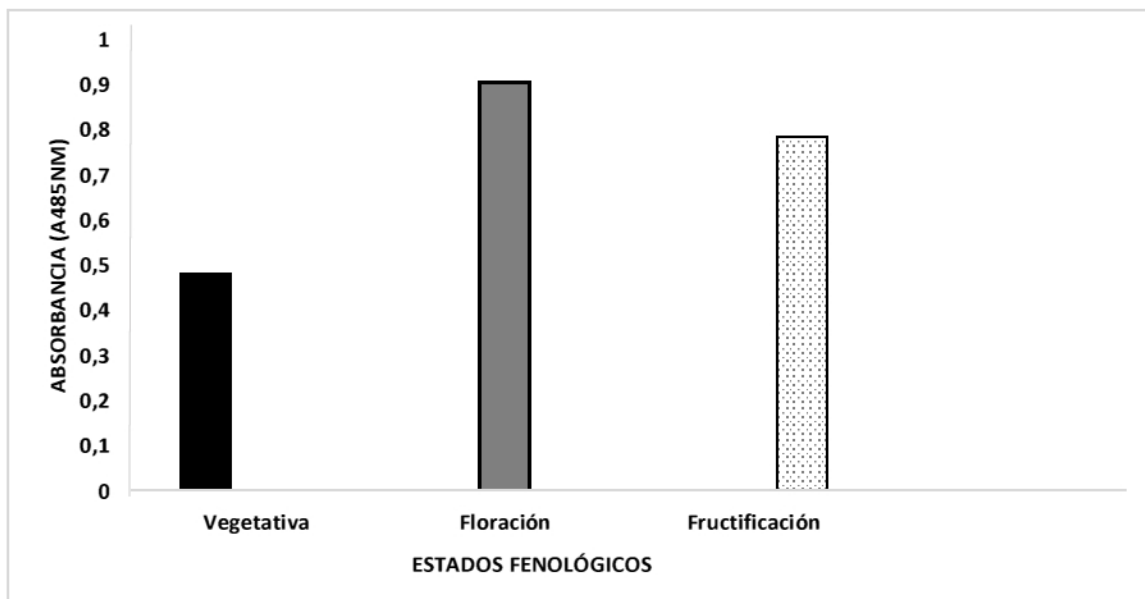


Figura 5. Valores de la actividad deshidrogenasa en los suelos de la plantas de frijol en sus tres fase fenológicas.

3.3 Valoración del número de aislamientos totales y total de microorganismo positivos en actividad antagonica.

En este estudio se aislaron un total de 252 microorganismos, 180 bacterias y 72 hongos, de los cuales 12 microorganismos (8 bacterias y 4 hongos), resultaron positivos en actividad antagonica frente a *T.cucumeris*, como se observa en la Figura 6, tomando un PIR del 45% según Elías y Arcos, 1984.



Figura 6. Relación entre el número total de aislamientos y los microorganismos con actividad antagónica.

3.3.1 Valoración del número de aislamiento por etapa fenológica en organismos epífitos.

Según los resultados de aislamientos bacterianos, se tiene un análisis de varianza con datos transformados con raíz cuadrada, en los datos obtenidos hay diferencias significativas ($<.0001$) para el modelo utilizado, hay diferencias significativas en las diluciones, al menos una de las diluciones tiene una carga bacteriana más alta en este caso es 10^{-4} , como observamos en la Figura 7. No hay diferencias significativas en las fases fenológicas, es decir que en las fases fenológica se aisló básicamente la misma cantidad de microorganismos.

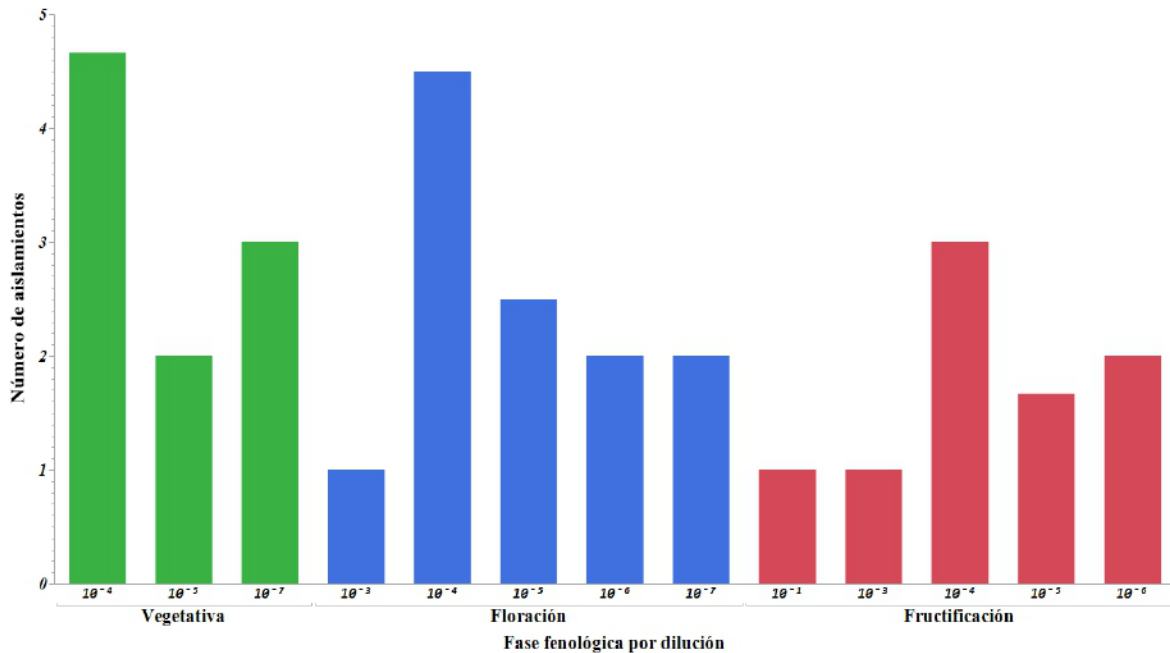


Figura 7. Valores de aislamiento por diluciones en los tres estados fenológicos, organismos epífitos (bacterias).

Como podemos observar (figura N°7) en los tres estados fenológicos de la planta de la dilución 10^{-4} se aisló la mayor cantidad de microorganismos, mientras que no hubo diferencias significativas en el número de aislamientos por fase fenológica.

En cuanto los aislamientos fúngicos el análisis estadístico (ANOVA) indica que no existe diferencias significativas, ni en las diluciones ni en fase fenológica.

En la fase de floración se obtuvo un mayor número de aislamientos, siendo la dilución 10^{-5} de la cual se pudo obtener el mayor número de microorganismos aislados, seguido de la dilución 10^{-4} . La fase fenológica de fructificación las diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} donde se observó el mayor número de aislamiento; mientras en la fase fenológica vegetativa hubo se aislaron la misma cantidad de fúngica de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} (Figura 8).

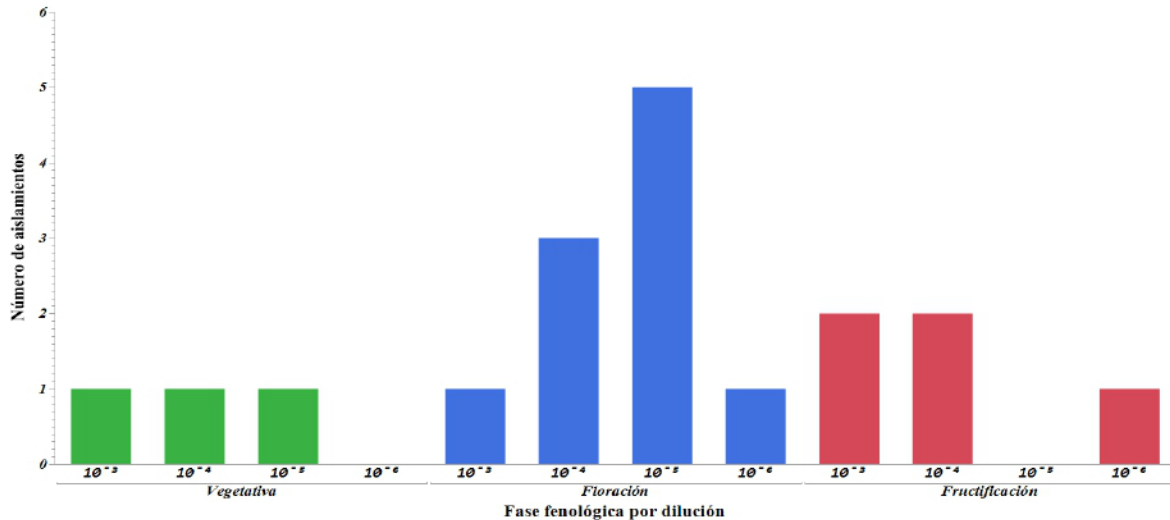


Figura 8. Número de aislamiento por diluciones en las diferentes fases fenológicas, organismos epífitos (hongos).

3.3.2 Valoración del número de aislamiento por etapa fenológica en organismos endófito.

Los resultados obtenidos (bacterias endófitas) muestran que en el análisis hay 36% de predicción de bacterias según el modelo utilizado, el análisis de varianza indica que el modelo es significativo, la fase fenológica es significativa, ya que se aisló una mayor cantidad de microorganismos en la fase fenológica vegetativa. Mientras que por sección de la filósfera según el análisis no hay diferencias significativas, es decir que no se muestra una diferencia entre el número de bacterias por sección de la hoja (ápice, sección media y base).

Al observar la figura 9, la fase que mayor diferencia obtuvo fue la fase vegetativa se obtuvo un número mayor de aislamientos. Además, no hay diferencias significativas por sección de la hoja (filósfera).

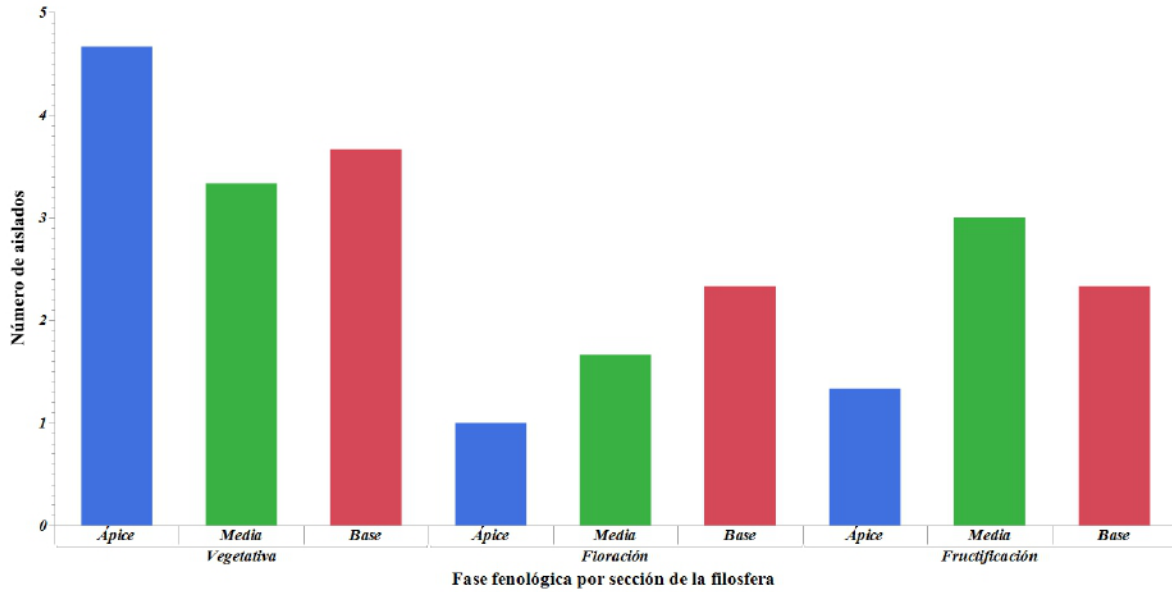


Figura 9. Aislamiento por fase fenológica de la parte endófito de la filósfera (bacterias). En cuanto a los aislamientos fúngicos, el análisis (ANOVA) demostró que hay diferencias significativas en la fase fenológica, pero no hay diferencias significativas en las secciones de la hoja. En la fase fenológica, el análisis demostró que la fase de fructificación presenta mayor cantidad de aislamientos fúngicos, respecto a las otras fases (Figura 10).

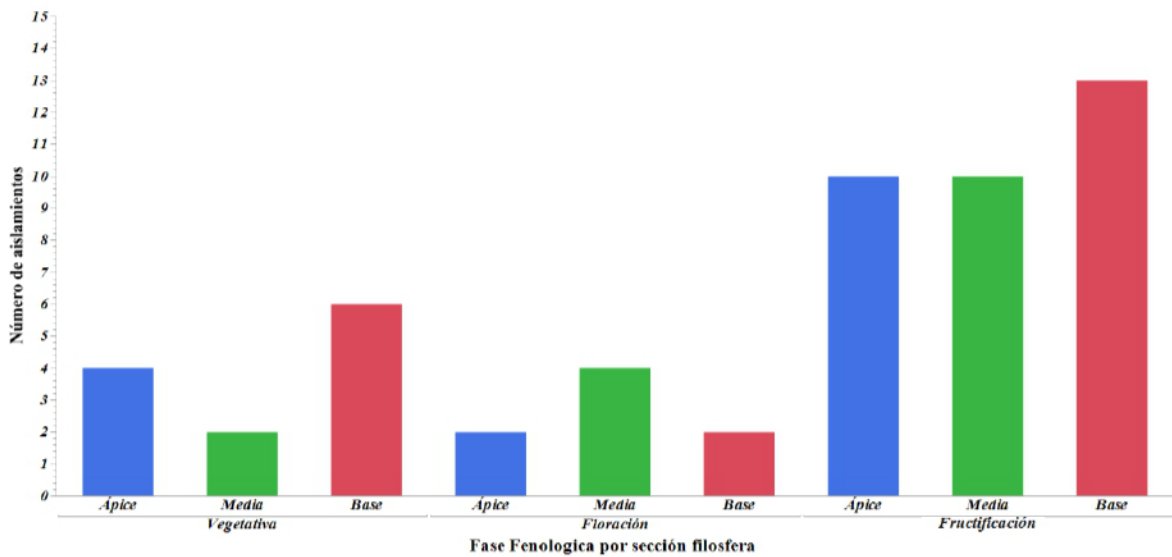


Figura 10. Aislamiento por fase fenológica y la parte endófito de la filósfera

3.4 Valoración del número de aislamiento por etapa fenológica en organismos de la rizosfera.

El análisis de varianza (ANOVA) del modelo es significativo, la dilución es significativa; es decir hay diferencias significativas entre cada una de las diluciones de las fases fenológicas. En la dilución de 10^{-2} , es de la que se obtiene el mayor número de aislamientos (figura, N°11). Según el análisis estadístico, ni la fase fenológica ni las secciones de la rizosfera muestran diferencias significativas entre ellas.

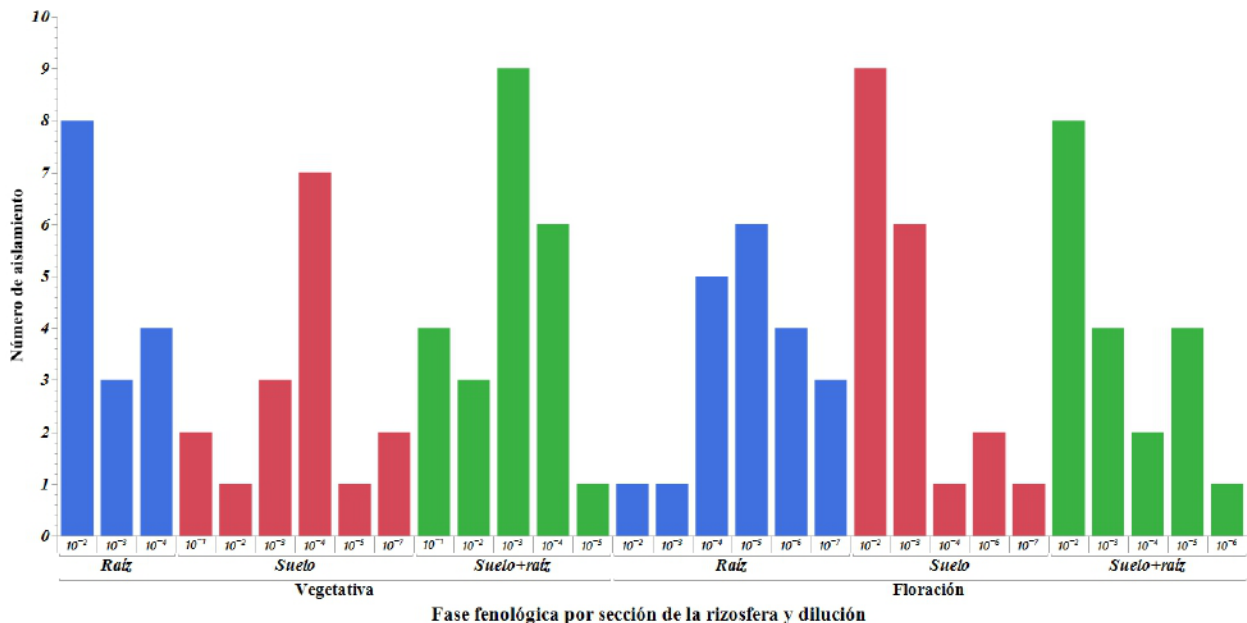


Figura 11. Aislamientos por dilución, fase fenológica, sección de la rizosfera (bacterias).

En la fase fenológica vegetativa, en la sección de la raíz, se aisló el mayor número de bacterias en la dilución 10^{-2} , en la sección suelo fue en 10^{-4} y en la sección suelo + raíz fue en 10^{-3} . Mientras que en la fase fenológica de floración se observó mayor número de aislamientos en 10^{-5} en la sección de la raíz, 10^{-2} en el suelo y 10^{-2} en suelo + raíz. (Figura 11).

En el análisis de varianza (ANOVA) para los aislamientos fúngicos de la rizosfera, se presentaron diferencias significativas entre las diluciones, siendo la dilución 10^{-2} de la cual se obtuvo mayor número de aislamientos. No hay diferencias significativas entre las fases fenológicas y para la sección rizosfera, en esta sección hubo

diferencias significativas, siendo la sección de raíz + suelo, donde se aislaron mayor cantidad de hongos (Figura 12).

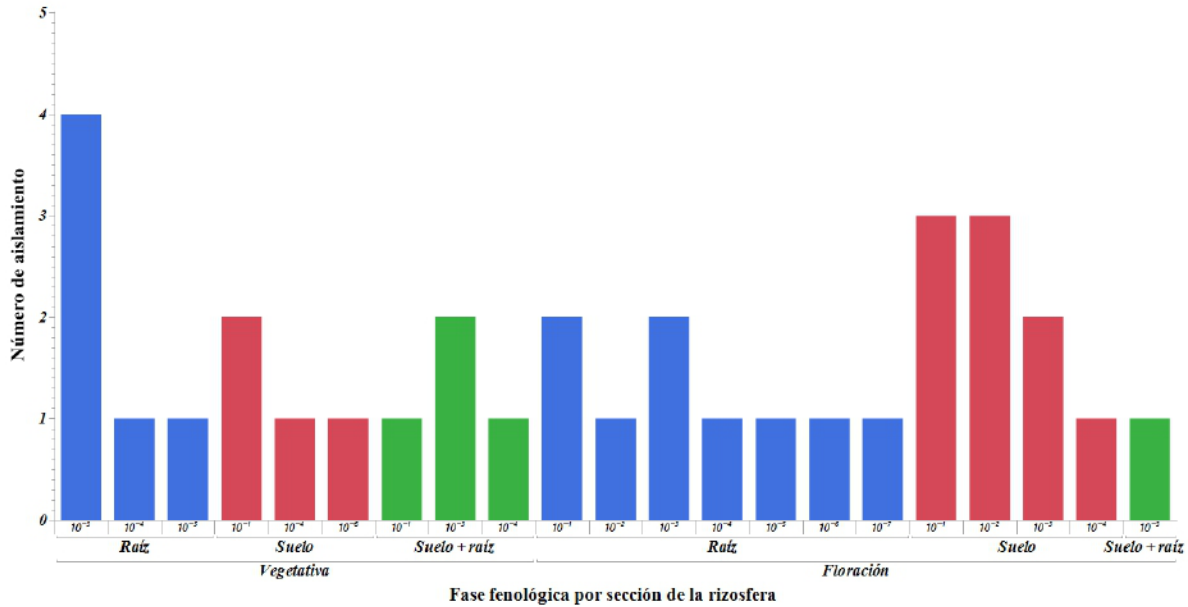


Figura 12. Aislamientos fúngicos por sección de la rizosfera y número de aislamientos (hongos).

3.5 Prueba antagónica de las bacterias contra *T.cucumeris* (bacterias).

Como se explicó en la metodología a cada bacteria se realizó una prueba antagónica dual, tomando como referencia las bacterias que mostraron un PIR del 45% en adelante. Solo 8 bacterias resultaron positivas para antagonismo según el PIR (figura N°13).

La bacteria Frep9 (*Pseudomonas spp*), que pertenece a la fase fenológica de fructificación obtuvo el PIR más alto con 87.6% de inhibición, seguido por ENVM29 (*Pseudomonas fluorescens*) que pertenece a la fase fenológica vegetativa, endófito parte media de la hoja con un PIR de 63.4%, TRV14 (*Acinetobacter*) que pertenece a la fase fenológica vegetativa, rizosfera, sección suelo + raíz presento PIR de 54.3%, TRFL2 (*Pseudomonas aeruginosa*) es la segunda de la sección suelo + raíz fase de floración que resultó positiva con un PIR 51%, mientras que TRV1AP4 (*Pseudomonas aeruginosa*) suelo +raíz fase fenológica vegetativa presento 50% de PIR (figura N°10). Todos los organismos identificados presentaron un PIR del 50% en adelante, mientras que TRFL4 (48.9%), RFL4 (49.5%) y RV10 (48.4%) que

representan a las fases fenológicas de floración y vegetativa (*Pseudomonas aeruginosa*).

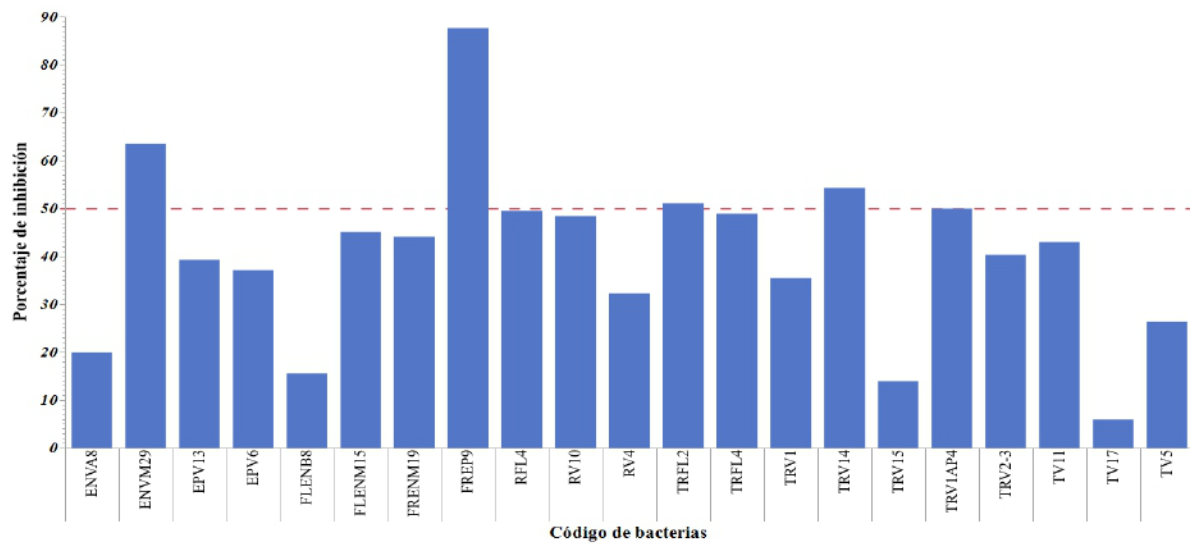


Figura 13. Porcentaje de inhibición de las bacterias aisladas (PIR 45 %).

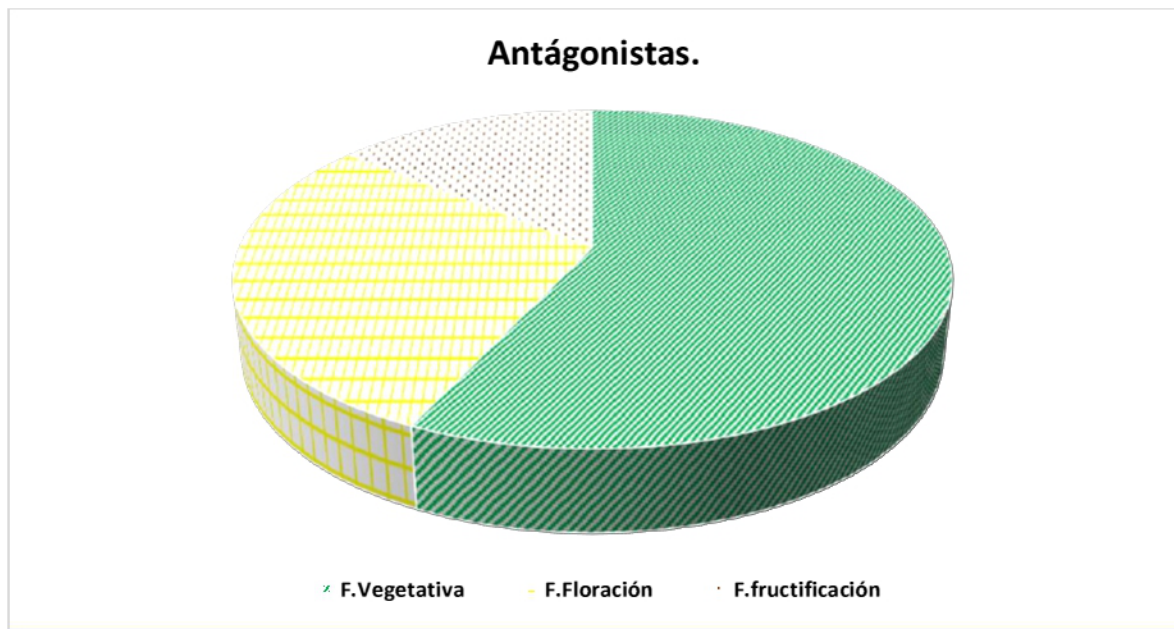


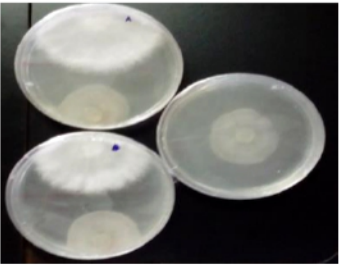
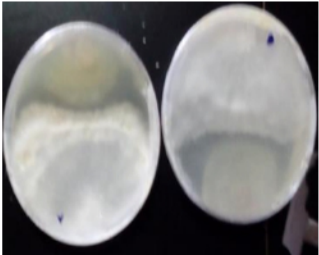
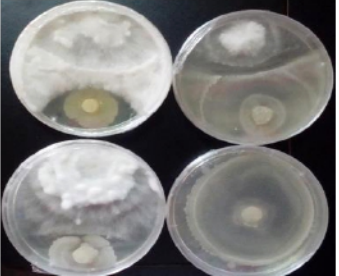

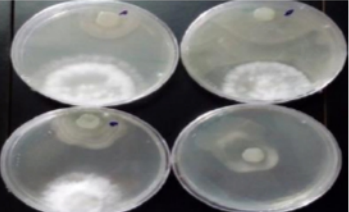
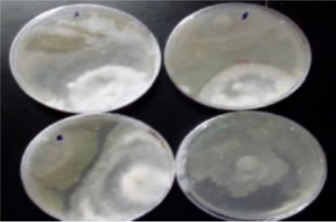
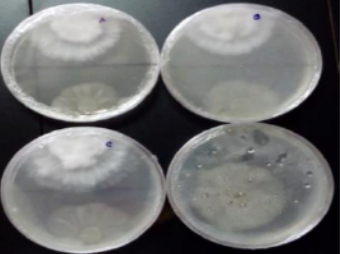
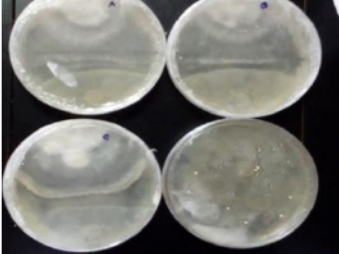
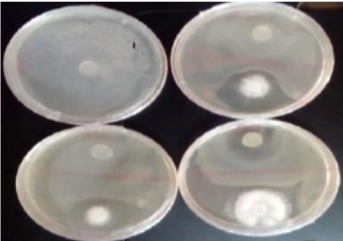
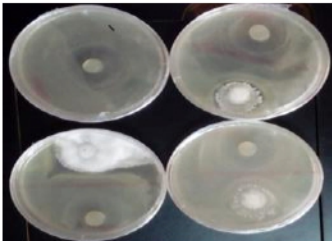
Figura 14. Bacterias positivas en antagonismo por fase fenológica.

De los organismos con PIR positivo, el 57% pertenece a la fase fenológica vegetativa, el 29% a la etapa de floración y el 14% pertenece a la fase de

fructificación (figura N°14). De este 57% de la fase vegetativa, 3 son de la rizosfera, 2 son de la sección de suelo + raíz y uno a la sección de raíz. De esta misma fase fenológica se obtuvo un endófito de la sección media de la hoja. En cuanto a la fase de floración, los tres positivos son de la rizosfera uno de la raíz y 2 suelo + raíz, y el único positivo en la fase fenológica de fructificación fue de la parte epífita de la planta específicamente de la sección epífita.

Seis de los aislamientos bacterianos positivos (PIR) son de la sección de la rizosfera (esto representa el 71.4% de los antagonistas) mientras que en la filósfera sólo se obtuvo dos positivos (uno epífita y otro endófito representando el 28.5%) (tabla 5).

Tabla 5. Bacterias positivas en actividad antagónica (enfrentamientos días 1 y 7).

Código	Día 2	Día 7
EnV29		
TRV1AP4		
RV10		
TRFL2		
FREP9		

3.6 Pruebas antagónicas. Porcentaje Inhibición de los enfrentamientos antagónicos entre hongos aislados y el patógeno (*T.cucumeris*).

De las tres fases fenológicas (vegetativa, floración y fructificación), en las pruebas antagónicas solo cuatro hongos de los 72 enfrentamientos resultaron positivos en PIR, todos fueron de la parte epífita de la planta, a tener en cuenta que al sexto día de medición, el patógeno (*T.cucumeris*) cubría todo el plato y en la mayoría de los enfrentamientos cubría los aislamientos enfrentados frente al patógeno.

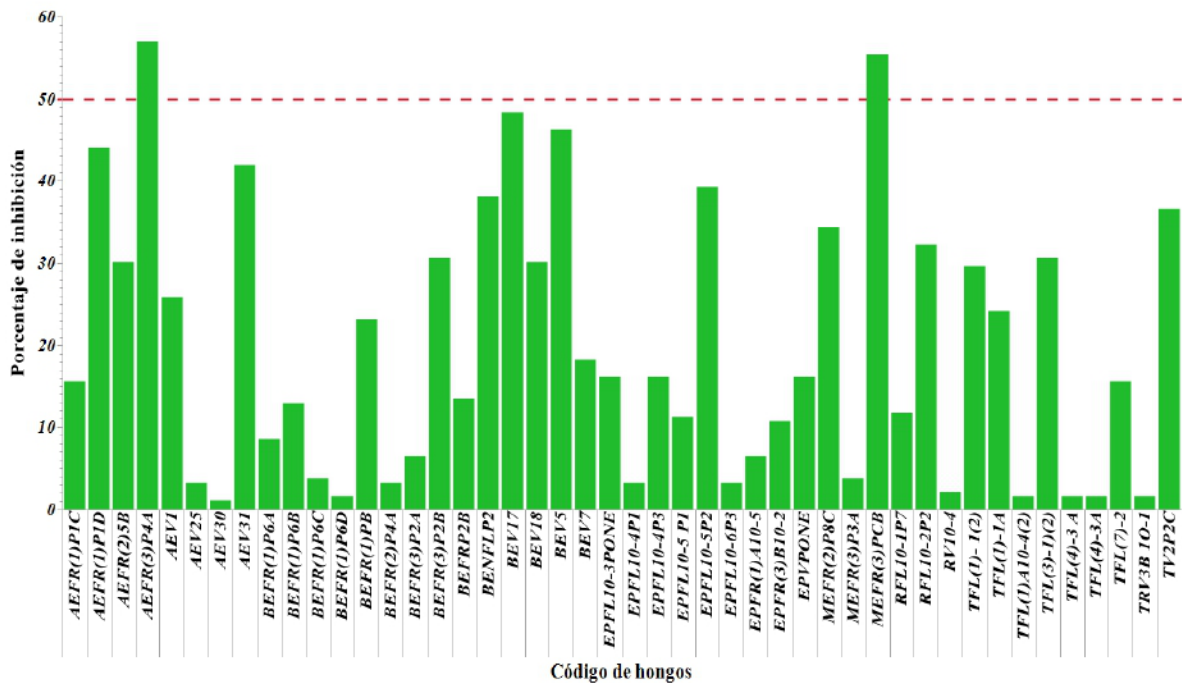


Figura 15. Porcentaje de inhibición de los hongos aislados frente a *T. cucumeris*.

Como apreciamos en las figuras número 15 y número 16, solo cuatro hongos resultaron positivos en PIR, dos de la fase fenológica de fructificación. MEFR (2)PCB fructificación endófito parte media de la hoja presentó un Porcentaje de Inhibición Radial (PIR) de 55.4%, mientras AEFR(3)P4A ápice endófito fructificación presentó un PIR de 57% el último día de medición. Tenemos BEV17 con un PIR de 48.4%, pertenece a la fase fenológica vegetativa, sección endófito de la rizosfera. BEV 5 con un PIR de 46.2 (figura 15 y 16).

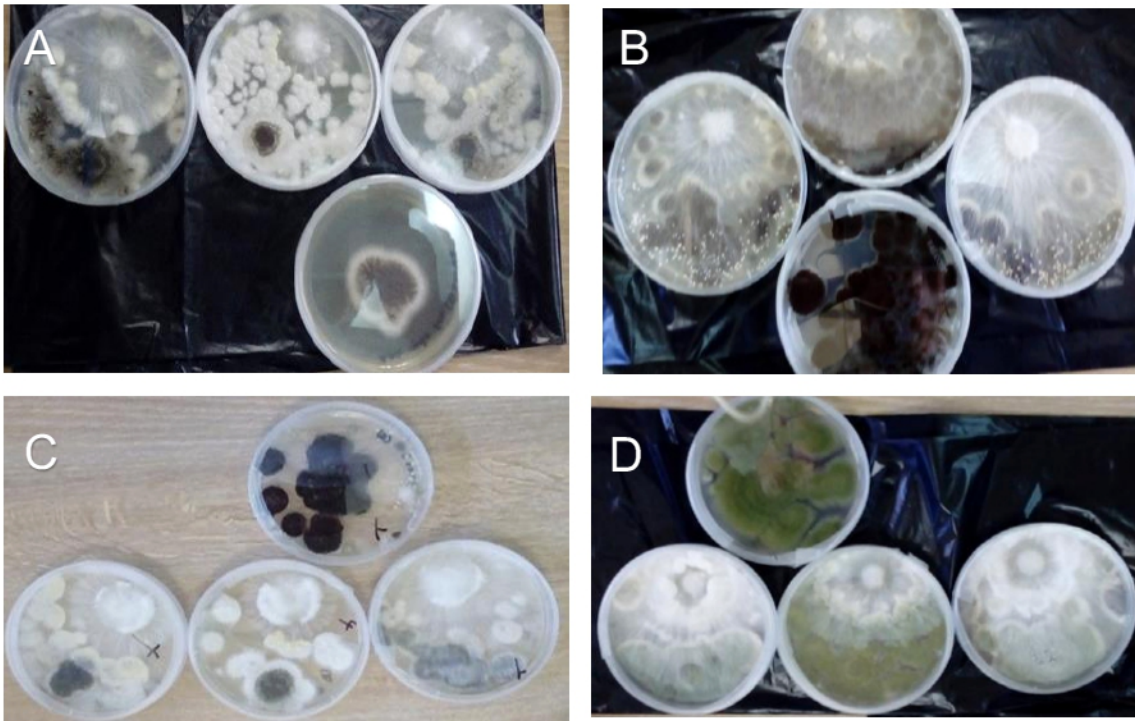


Figura 16. Pruebas positivas en antagonicas de A) AEFR(3)P4A, B) MEFR(3)PCB, C) BEV5 Y D) BEV17(séptimo día de medición).

3.7 Resultados de las pruebas (Apis 20E y microcultivo), para identificación de microorganismos positivos en actividad antagonica.

Las bacterias positivas en PIR (antagonicas), se les realizo tinción Gram, identificándose como bacterias Gram negativas, a las cuales se les aplicó la prueba de api 20E para su posterior identificación.



Figura 17. Pruebas Api 20E para organismos Gram negativos.

La bacteria Frep 9 (*Pseudomonas sp*), ENVM29 *Pseudomona fluorensce*, TRV14 que observamos en la figura17 pertenece al género *Acinetobacter* al igual que RV10 y TRFL2, TRFL4 y TRV1AP4 pertenecen a la especie *Pseudomonas Aeruginosa*.

A los hongos con PIR positivo, se les realizó la técnica de microcultivo para identificarlos. Estos fueron: AEFR(3)p4a: ápice endófito fructificación que resulto tener un PIR de 57% como muestra la figura 18, perteneciente al género *Colletotrichum*. MEFR(3)pcb que con el microcultivo se observó que pertenece al género *Aspergillus*.

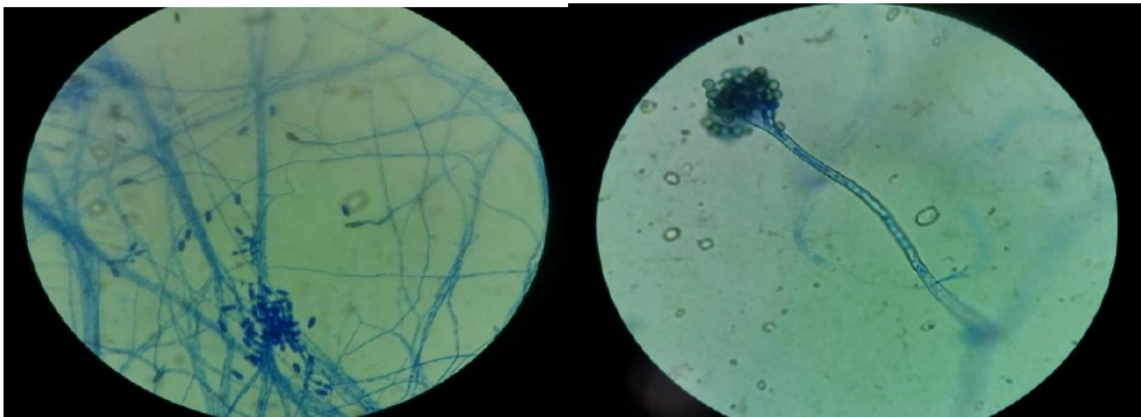


Figura 18. Observaciones microscópicas de *Colletotrichum* e *Aspergillus*, obtenida de la técnica de microcultivo (objetivo de 100x).
Fuente. Cámara de Samsung J5.

En la Figura 18, podemos observar los conidios del *Colletotrichum* (AEFR(3)p4a y *Aspergillus* MEFR(3) respectivamente, son hongos filamentosos. Ambos se aislaron pertenecen en estado fenológico de fructificación sección endófito de la filósfera.

Mientras que BEV17 con un PIR de 48.4%, fue aislado en la fase fenológica vegetativa, sección endófito de la rizósfera y BEV5 con un PIR de 46.2% pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* respectivamente, según la identificación, como observamos en la figura N° 19.

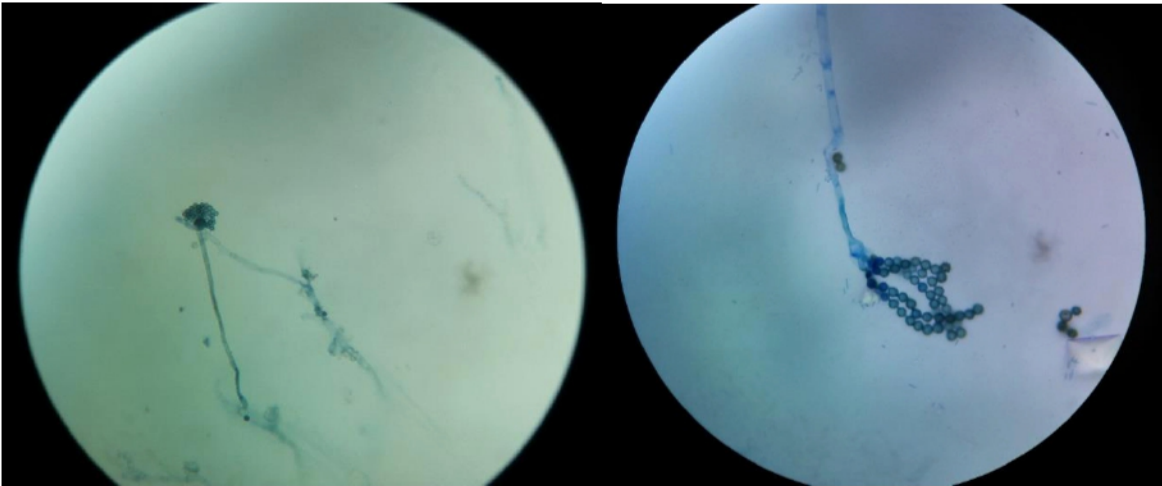


Figura 19. Observaciones microscópicas de los géneros *Aspergillus* (BEV17) y *Penicillium* (BEV5), técnica microcultivo (objetivo de 100x).

CAPÍTULO IV
DISCUSIONES

4.0 DISCUSIONES.

Existen diversos parámetros considerados clave para determinar la calidad del suelo, aquellos de naturaleza física y físico-química (estabilidad de agregados, pH, conductividad eléctrica), química (parámetros nutricionales y fracciones de carbono), como del tipo microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o diversas actividades enzimáticas) (Ramos *et al.*, 2007). Es por eso que en este trabajo se efectuaron estudios a nivel físico-químico del suelo, como respiración o producción total de CO₂ del suelo y actividad de la enzima deshidrogenasa.

La medición de CO₂ producido es una estimación de la actividad y, por lo tanto de la presencia microbiana, tal actividad varía en función de muchos factores, como: el uso del suelo, mineralogía, cobertura vegetal, practica de manejo, calidad de residuos que entran al sistema y factores ambientales (Burton *et al.*, 1986).

La respiración del suelo se define como la producción total de CO₂, por unidad de área y de tiempo y se debe a la respiración de organismos edáficos, raíces, hifas de las micorrizas y en menor extensión, a la oxidación bioquímica de los compuestos de carbono (Lloyd y Taylor, 1994). Al interpretar los resultados (respiración microbiana del suelo) en los suelos de las plantas de frijol – poroto, el suelo de la fase fenología vegetativa presento una producción total de CO₂ de 63.36 mg CO₂.100g⁻¹, mientras que el suelo de la fase de floración presentó una tasa de respiración de 58.7mg CO₂.100g⁻¹; y la fase fenológica de fructificación presentó una tasa de 54.53 mg CO₂.100g⁻¹. Concordando con (Gómez, 2017), quien comparo la producción total de CO₂, en suelo de fincas orgánicas y fincas con el uso de agroquímicos; En los suelo de las fincas orgánicas siempre obtuvo valores superiores a 45 mg CO₂.100g⁻¹, mientras que en los suelos de fincas en la que se utiliza agroquímicos, observó que el porcentaje de respiración fue inferior 35.8 CO₂.100g⁻¹. Se Estipula que los suelos sin uso de agroquímico presentaron índice de respiración mayor debido a la adición permanente y continua de fuentes exógenas de materia orgánica lábil al suelo y la subsecuente estimulación de los microorganismos heterotróficos (Araújo *et al.*, 2008; Bettiol *et al.*, 2002; Saffigna *et*

al., 1989). Los agroquímicos son fuente de carbono y nitrógeno y se degradan principalmente por la actividad microbiana. La entrada continua de estos compuestos en el ecosistema del suelo puede afectar los microorganismos y su actividad, lo que ocasiona modificación de los procesos biológicos esenciales para la fertilidad y la productividad de los cultivos (Alvear et al., 2006; Cycón et al., 2010).

La actividad deshidrogenasa es una medida representativa del metabolismo degradativo del suelo (Skujins, 1976), puesto que se trata de un tipo de enzima exclusivamente intracelular que por tanto está asociado a células viables, también se considera un buen indicador de la actividad microbiana total. En cuanto a las pruebas realizadas para medir el efecto de la actividad de la enzima deshidrogenasa podemos observar que el suelo de la fase fenológica de floración presentó la mayor tasa de actividad con un porcentaje de humedad superior a 17%, mientras que el suelo de la fase fenológica de fructificación presentó una absorbancia de 0.784 (A485nm) con un porcentaje de humedad superior al 17%, y el suelo de la fase fenológica vegetativa, presentó la tasa más baja de actividad de la enzima deshidrogenasa con una absorbancia de 0.480 (A485nm) y humedad de 16%. Concordando con lo reportado por (Brzezinska et al., 1998), donde compararon como afectan diversos parámetros ambientales, la actividad de la enzima deshidrogenasa en los suelos. Obteniendo como resultado que la actividad de la enzima deshidrogenasa es mayor en suelos inundados o suelos con mayor humedad, que en suelos secos. La humedad de los suelos de nuestro estudio fue mayor al 18%. Por otro lado, se puede evidenciar de manera clara que a porcentajes de humedad bajos, la actividad microbiana es menor y que un incremento en el agua del suelo reduce el estado de aireación por reducción del espacio de los poros llenos de aire disponibles para la difusión de gases y la actividad deshidrogenasa es mayor en suelos inundados que en suelos no inundados Brzezinska *et al.*, (1998). Aunque también hay otros factores, que señalan que la actividad y estabilidad de las enzimas en el suelo es regulada por muchos factores como pH (Frankenberger y Johanson, 1983; Trasar-Cepeda y Gil-Sotres, 1987; Dick *et al.*, 1988), biomasa microbiana (Saffigna *et al.*, 1989; Häussling y Marschner, 1989; Srivastava y Singh, 1991), vegetación (Juma y Tabatabai, 1978; Harrison, 1983; Perucci *et al.*, 1984),

prácticas de manejo del suelo y de los cultivos (Perucci y Scarponi, 1985; Beck, 1990; Kandeler y Eder, 1993), materia orgánica del suelo (Juma y Tabatabai, 1978; Chhonkar y Tarafdar, 1984), minerales de arcilla (Makboul y Ottow, 1979; Huang *et al.*, 1995) y el contenido de humedad del suelo (Harrison, 1983; West *et al.*, 1988).

En cuanto a la valoración de aislamientos bacterianos y fúngicos de la sección epífita, se observó una prevalencia de aislamientos microbiológicos bacterianos sobre los hongos, esto tiene concordancia con lo expuesto por Andrews y Harris (2000) y Lindow y Brandl (2003) quienes apuntan a que las bacterias podrían tener una ventaja competitiva con respecto a la colonización de la filósfera frente a los demás microorganismos, ya que se ha encontrado que la presencia de células bacterianas en las hojas oscila entre 10^6 y 10^7 células/cm². En estudios simultáneos de hongos y bacterias, tanto de epifitos como de endófitos, en un sola planta se ha observado la coexistencia de estas microbiotas, Gao *et al.*, (2010) y Herre *et al.*, (2007), mencionan implicaciones favorables en la salud de la planta y posibles alternativas propias para su protección. También Kumar y Hyde (2004), Khan *et al.*, (2007) y Douanla-Meli *et al.*, (2013) destacan la importancia de la biodiversidad microbiana en el desarrollo y protección de la planta contra patógenos.

Según el análisis de varianza de los aislamientos endófitos de nuestros resultados, mostraron diferencias significativas en las fases fenológicas, siendo la fase vegetativa donde se aisló más microorganismo bacterianos, y la fase fenológica de fructificación fue donde mayor aislamientos fúngicos hubo. Concordando con los resultados del estudio de Jaques *et al.*, 1994; Donde evaluaron las diferentes edades y posiciones de las hojas respecto a los microorganismos presentes y concluyeron que estos dos factores influyen tanto en la densidad como en la diversidad de las poblaciones presentes en el filoplano, ya que las hojas viejas soportan una mayor cantidad de microorganismos que las hojas nuevas, y el número de estos aumenta con la edad de la planta. Las hojas viejas proporcionan una mayor disponibilidad de nutrientes y generan un microambiente apto para permitir una mayor colonización de los microorganismos (Weller *et al.*, 1980). Nuestros resultados mostraron diferencias significativas en las diluciones, donde

tanto en aislamientos fúngicos y bacterianos hubo mayor aislamiento en la dilución de 10^{-2} , la densidad poblacional de las bacterias endófitas puede variar de 102 a 109 aislamientos y puede ser afectada por muchos factores, entre los cuales tenemos la fase fenológica del cultivo y la interacción de las bacterias con los factores climáticos (Toloza, 2013). Durante el desarrollo vegetativo de las plantas, la mayor parte de la energía de la planta se dirige al follaje (Toloza, 2013).

La sección de la rizosfera no mostro diferencias significativas en las fases fenológicas, más en los aislamientos fúngico sección de suelo+raíz, si presento diferencias significativas al igual que en las diluciones, siendo la dilución de 10^{-2} se aisló mayor cantidad de microorganismos. La colonización de las raíces por los hongos comienza con el reconocimiento de compuestos específicos en los exudados de las plantas, los cuales desempeñan un papel importante en las interacciones de la población fúngica y bacteriana del suelo (Toloza *et al.*, 2013).

Calvo, 2008 estudió las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa, con la diferencia de que el comportamiento general de la rizosfera para las dos regiones registra siempre una mayor población de bacterias totales que estuvieron entre las diluciones de 10^6 y 10^8 ufc/gr en comparación a la población de hongos que siempre estuvo entre 10^4 y 10^5 ufc/gr. En nuestro estudio tanto de bacterias como hongos la dilución donde mayor aislamientos fue de 10^2 , mientras que en entre las fases fenológicas no hubo diferencias significativas, esto pudiera explicarse partiendo del hecho que las tres muestras se obtuvieron del mismo terreno con el mismo pH y cantidad de fósforo, ya que según Alexander, 1994, el pH podría ser determinante en el desarrollo de las poblaciones microbianas en suelos alcalinos habría mayor cantidad de bacterias. Otro factor importante que puede influenciar las poblaciones microbianas es la cantidad de fósforo disponible.

De las bacterias positivas en PIR (antagónicas), 2 son de la sección de la filósfera y 6 de la sección de la rizosfera. En relación a las diferentes formas en que las bacterias se asocian con la raíz, parece ser que todas utilizan los mismos mecanismos para promover el crecimiento de las plantas: facilitan la adquisición de nutrientes, producen compuestos para la regulación del crecimiento vegetal

hormonas de crecimiento vegetal, disminuyen indirectamente los efectos adversos de microorganismos patógenos, al producir compuestos antimicrobianos y/o limitar la disponibilidad de nutrientes para los patógenos (Bashan *et al.*, 2004).

De los hongos positivos en PIR (antagonistas), 4 son de la sección endófito de la filósfera, dos de la fase fenológica de fructificación y dos de la fase vegetativa. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en relación a la presencia de hongos endófitos como posibles controladores biológicos, en este sentido las interacciones entre los hongos fitopatógenos y los hongos endófitos, son conocidas desde principios del siglo XX (Weindling, 1932), siendo ya desde entonces objeto de estudio el uso de estos hongos endófitos como Agente de Control Biológico (ACB) (Mehrotra *et al.*, 1998). Actualmente se sabe que los tejidos vegetales que contienen hongos endófitos afectan la resistencia de sus hospedantes frente a parásitos (Miller, 1986). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que las plantas inoculadas con endófitos incrementan su crecimiento (Barka *et al.*, 2002), mejoran la resistencia a la sequía (Swarthout *et al.*, 2009), toleran condiciones de suelos no aptos (Malinowski *et al.*, 2005), tienen mayor acceso a nutrientes (Robin *et al.*, 2000) o mejoran la defensa frente a animales herbívoros (Bernstein and Carroll, 1977; Carrol, 2012) y patógenos (Arnold *et al.*, 2003).

De los ocho microorganismos bacterianos positivos en antagonismo, 7 son del género *Pseudomonas spp* y solo uno del género *Acinetobacter*, y seis de la sección de la rizosfera. El efecto antagonista de bacterias en el tratamiento a la semilla de frijol común contra hongos fitopatógenos que habitan en el suelo, se reportó para el género *Pseudomonas spp* inhibiendo in vitro el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani* y en condiciones de campo las bacterias estimularon el crecimiento de las plantas de los cultivares estudiados en su investigación (Ramírez, 2014).

La interacción de microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas, hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*, son usualmente catalogados como agentes de control biológico y microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Las bacterias del género *Pseudomonas spp.*,

las cuales solubilizan algunos nutrientes poco móviles del suelo, como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de biomasa (Vázquez *et al.*, 2000).

Los cuatro hongos positivos en actividad antagónica fueron endófitos de la hoja, un *Colletrichum*, dos *Aspergillus* y un *Penicillum*. Según Venkayasubbaia *et al.*, 2008, *Aspergillus niger* (van tiegh) aislado de plántulas de café es antagónico contra de la pudrición del collar causada por *R.solani* (Kuhn) en estudios in vitro, ya que el modo de interacción hifal y el parasitismo de *R.solani* por *Aspergillus niger* indicaron el crecimiento directo del micoparásito hacia su hospedador y como consecuencia, la hifa del hospedador colapsó y finalmente se desintegró. En relación con *Colletotrichum* con este hongo endófito se realizó un estudio en La India para evaluar su efecto antagónico frente a *Pestalotiopsis theae* obteniendo resultados positivos (Rabha *et al.*, 2014).

Según estudio realizado por Campuzano *et al.*, 2017, donde evaluaron hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *R. solani*, de todos los hongos aislados sólo obtuvo como resultados positivos, el género *Rhizopus*, mientras que en otro estudio de Tovar 2008, en el cual se enfrentó el género *Trichoderma* contra *R.solani* con resultados positivos.

La capacidad antagónica de algunas cepas de hongos hacia hongos fitopatógenos se puede definir con base en la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos (Cook, 2000). Esta capacidad es el resultado de la agresividad del antagonista y de la susceptibilidad del patógeno (Paul, 1999); Sempere *et al.*, 2008). Lo anterior se hace evidente por la variación observada con respecto a la selectividad de algunas cepas de *Aspergillus* para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos, en comparación con las cepas de *Trichoderma* cuyo rango de hospedantes es al parecer, menos específico.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En los ensayos de respiración microbiana de cada estado fenológico, resultó con mayor actividad el suelo de la fase fenológica vegetativa, seguido el de fase de floración y el de la fase de fructificación.
2. En la actividad enzimática de la deshidrogenasa, la fase fenológica de floración obtuvo el mayor valor de absorbancia (mayor actividad de la enzima), seguido de la fase fenológica de fructificación y la de menor absorbancia fue la fase vegetativa, este suelo tenía el menor porcentaje de humedad (16%).
3. De los aislamientos bacterianos ocho presentaron actividad antagónica, (seis pertenecen sección de la rizosfera, uno de la sección epifita de la filósfera y un endófito).
4. De los aislamientos bacterianos positivos en antagonismo, 4 son de la fase fenológica vegetativa, 3 de la fase de fructificación y uno de la etapa de floración.
5. Las bacterias positivas en PIR: Frep9 (*Pseudomonas spp*), Env29 (*Pseudomonas fluoresces*), Trv14 (*Acinetobacter*), Rv10, Trf12, Trf14 y Trv1ap4, pertenecientes a el género *Pseudomona aeruginosa*.
6. De los enfrentamientos antagónico fúngicos (72), solo cuatro resultaron con PIR superior al 45%: dos de la fase fenológica vegetativa y 2 de la fase fenológica de fructificación, Todos de la sección endófito de la filósfera. Los hongos positivos en PIR: AEFR(3)p4a (*Colletotrichum*),MEFR(3)pcb (*Aspergillus*), BEV17 (*Aspergillus*) y BEV5 (*Penicillium*).

CAPÍTULO VI
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere realizar el estudio con más muestras por estado fenológico, y de la misma manera más muestras de suelo, para poder determinar mejor la abundancia de microorganismos.
2. Se recomienda hacer pruebas de campo con los organismos que resultaron positivo en antagonismo, para tratar de determinar el comportamiento de estos microorganismo frente al patógeno en condiciones de campo y observar si tiene el mismo comportamiento que en el laboratorio.
3. Hacer pruebas de identificación a todas las cepas aisladas, ya que algunas de estas sepas podrían ser promotores de crecimientos importantes para otros estudios. Incluso a los que resultaron hacer pruebas moleculares para poder determinar hasta el nivel de especie.
4. Hacer las pruebas antagónicas con otros medios de cultivos para observa si el comportamiento de los microorganismos que resultaron positivos poseen el mismo comportamiento con diversidad de medios.

CAPÍTULO VII
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acebo, Y., A. Hernández, M. Heydrich, M. El Jaziri and A.N. Hernández. 2013. Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao L.*): a review. p. 41-48.
- Acebo, Y., A. Hernández, M. Heydrich, M. El Jaziri and A.N. Hernández. 2012. M
- Acosta-Gallegos, J. A. and Kohashi-Shibata, J. 1989. Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry-bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. p. 81-93.
- Adetutu, E., Ball, A., y Osborn, A. 2008. *Azoxystrobin* and soil interactions: degradation and impact on soil bacterial and fungal communities. J. Appl. Microbiol. P.1777 – 1790.
- Agrios, G. 2005, fitopatología, 2da edición. México, Limusa.p.952.
- Agrios, G. 1988. Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. p.803.
- Agrios, G. 1996. Fitopatología. 2. ed. México, MX. Editorial Limusa S.A.p. 838.
- Alexander, M. 1994. Introducción a la Microbiología de Suelos. Editor S. A. México.
- Álvarez, F., Benítez, G., Rodríguez A., Grande, M., Torres, M., Pérez, R. 2014. Guía técnica para la producción de frijol común y maíz.p.7 – 21.
- Álvarez-Castellanos, P., Bishop, C. y Pascuai-Villalobos, M. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochemistry.p.99-102.
- Alvear, M., Lopez, R., Rosas, A. y Espinoza, N. 2006. Efecto de la aplicación de herbicidas en condiciones de campo sobre algunas actividades biológicas. Rev. Cien. Suelo y nutr. p. 64 - 76.
- Andrade, G. 2004. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. p. 51-69. En: Varma, A., L. Abbott, D. Werner y R. Hampp. Plant surface microbiology. Springer-Verlag, Berlin.
- Andrade, G. 2004. The functional groups of microorganism used as bio-indicator on soil disturbance caused by biotech products such as *Bacillus thuringiensis* and Bt transgenic plants. p. 121- 132. En: Varma, A., L. Abbott, D. Werner y R. Hampp (eds.). Plant surface microbiology. Springer-Verlag, Berlin.
- Andrews, J., Harris, R. 2000. The ecology and the biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annu. Rev. Phytopathol.p. 145-180.

- Antoun, H., D. Prevost. 2006. "Ecology of Plant Growth Promoting *Rhizobacteria*", en: Z. A. Siddiqui (ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht .p.1–38.
- Araújo, A., Santos, V, and Monteiro, R. 2008. Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in Piauí state, Brazil. Eur. J. Soil Biol.p.225-230.
- Arenas, R.1993.Micología Medica ilustrada. Segunda edición. McGraw Hill. México D.F.p.352.
- Arnold, A., Mejía, D., Kylló, E., Rojas, Z., Maynard, N., Robbins, and Herre, E. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.p. 100.
- Askew, D., y Laing, M. 1994. The In Vitro screening of 118 Trichoderma isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* an evaluation of different environmental sites on Trichoderma as sources of aggressive strains. Plant Soil.p.159, 277-281.
- Badii, M; Tejada, L., Flores, A., López,A., Quiroz, H. 2000. Historia, fundamentos e importancia. p. 3-17. UANL. Monterrey.
- Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J and Belarbi, A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on Botrytis cinerea and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control .p. 135–142
- Barlett, D., Clough, J., Godwin, A., Hall, A., Hamer, M., y ParrDobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. Pest Manag. p.58:647 – 662.
- Bashan Y., Holguin,G ., De Bashan , L. 2004. "Azospirillum-Plant Relationships: Physiological, Molecular, Agricultural and Environmental Advances (1997-2003)".
- Beaver, J., Godoy, G., Rosas, J., Steadman, J. 2002. Estrategias para seleccionar frijol común con mayor resistencia a mustia hilachosa. Agronomía Mesoamericana.p.67-72.
- Beck, T. 1990. Der Einfluß langjähriger Bewirtschaftungsweise auf bodenmikrobiologische Eigenschaften. Kali-Briefe.p. 17-29.
- Beltrán, M., Ogurai, T., Manzo, G., Arias, C. 2006. Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas? Revista Mexicana de Fitopatología.p.50-58.
- Benhamou, N., Brodeur, J .2000. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*. The causal agent of green mold. Phytopathology .p.932–943.
- Benítez, T., Rincón, M., Limón, A., Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology .p.249–260.

- Bernstein, M., and CARROLL, G. 1977. Microbial populations on Douglas fir needle surfaces. *Microbial Ecology*.p.41–52.
- Bettiol, W., Ghini, R., Galvão, J., Ligo, M and Mineiro, J. 2002. Soil organisms in organic and conventional cropping systems. *Sci. Agric*.p.565-572.
- Bhattacharyya, P., D. Jha, D. 2012. “Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria* (PGPR): Emergence in Agriculture”. *World J. Microbiol. Biotechnol*.p.132–135.
- Bowman, G., y Delfino, J. 1980. sedimente oxygen demand techniques: A review and comparision of laboratory and *in situ* system.p. 491-499.
- Broughton, W., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus spp.*) - model food legumes.p. 252:55-128.
- Brzezinska M., Stepniewska Z y Stepniewski W. 1998. Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem*.p. 178-179.
- Burton, G. y Lanza, G. 1986. Variables affecting to electron transport system assays. *Applied and Environmental Microbiology*.p.931-937.
- Caballero-Mellano J. 2006. Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con plantas. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*.p. 154-161.
- Calvo, P., Raymundo, L., Zúñiga, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosus*) en la zonas alto Andinas.
- Campuzano, S., Urquijo, T., Valderrama J. 2017. Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *rhizoctonia solani*.
Can. J. Microbiol.p. 521-577.
- Carlile, M. y Watkinson, S. 1996. *The fungi*. 3rd ed. Academic Press, San Diego. .p.482.
- Carmona, M., Aguilera, M., Pérez, C., y Serey, I. 2006. Actividad Respiratoria en el horizonte orgánico de suelos de ecosistemas forestales del centro y sur de Chile. *Gayana Bot*.p.1-12.
- Carrol, G. 2012. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*.p.69.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortez, C., Gutierrez, A y Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microbiol*.p.929-935.
- Casa, G. 1989. *Micología General*. Edición I. Caracas, Venezuela.p.448.
- Casida, L. 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology* .p. 630-636.

Casida, L., Klein y Santoro, T. (1967). Soil Dehydrogenase Activity. Soil Science. p. 371-376.

Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., y Araujo, H. 2001. Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela.p.296-300

Chazan, 2008. Boletín informativo del frijol.p12. Disponible:<http://www.inia.gov.pe/boletin/BCIT/boletin0003/cultivo>) consultado el 17/02/2012.

Chet, L. (2003). Control Biológico de *Macrophomina* causante del tallo negro en girasol (*Helianthus annuus*L.) con el uso del antagonista *Trichoderma harzianum* condiciones de vivero y campo. (Resumen). XII Congreso Venezolano de Fitopatología, Maturín, Estado Monagas - Venezuela p 58.

Chhonkar, P y Tarafdar, J. 1984. Accumulation of phosphatases in soils. J Indian.p.32.

Contraloría De la República de Panamá, 2012 boletín informativo. https://www.contraloria.gob.pa/inec/Publicaciones/Publicaciones.aspx?ID_SUBCATEGORIA=4&ID_PUBLICACION=583&ID_IDIOMA=1&ID_CATEGORIA=2

Cook, R. 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology.p.95–116.

Cook, R. y Baker, K. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn.p. 539.

Cuesta, G., García, R., Abad, M y Fornes, F. 2010. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. Article in press. Journal of Environmental Management.p.1-5 .

Cundom, M., Mazza, S., Gaiad, M., Castañon, M., Gutiérrez, M., de Arriola, S y Coutinho, M. 2002. Actividad antagónica in vitro de Hongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. En: [http:// www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-037.pdf](http://www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-037.pdf); consulta: abril de 2008.

Cycoń, M.; Piotrowska-Seget, Z.; y Kozdrój, J. 2010. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soil. Intern. Biodeter. Biodegrad.p.316 – 323.

De Costa, D., and Erabadupitiya, H. 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. Postharvest Biology and Technology.p.31-39.

De la Garza, G. 1996. Fitopatología General, Facultad de Agronomía, imprenta Universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León.p.4.

DeBach, P. 1977. Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ed. MundiPrensa, Madrid.p.399. Fuente: Dirección Nacional de Agricultura y Direcciones Regionales – MIDA, año agrícola 2012.

Díaz, M. 2011. Incidencia de *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* Y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Villa Clara, Cuba. p. 100.

Dick R., Rasmussen P y Kerle E. 1988. Influence of longterm residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheatfallow system. Biol Fertil Soils.p. 159-164.

Douanla-Meli, C., Langer, E y Moufao, F. 2013. Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus limon. Fungal Ecology .p. 212-222.

Ezziyyani, M., Pérez, S., Requena, M., Rubio, L y Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología .p. 69-78.

FAO.2014. The state of food and agriculture innovation in family farming.

FIHA. 2007. Deterioro pos cosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias,4:2-5,<http://fhia.org.hn/downloads/fhiainfdic2007.pdf>.Accesada agosto 2018.

FIRA. 2015. Panorama agroalimentario Frijol. En sitio web: http://www.fira.org/pdf/Panorama_agroalimentario_frijol consultado en agosto del 2018.

Frankenberger, T. and Johanson, J. 1983. Factors affecting invertase activity in soils. Plant and Soil.p.313-323.

Gálvez, G., Franco, T., Mora, B y Marie Rojas, M. 1987. Publicación del centro de Información sobre el frijol y el programa del frijol- patología bajo un proyecto especial financiado por el centro Internacional de investigación para el desarrollo. `

Gálvez, G., Mora, B., Pastor, M. 1982. Web blight. In: Pastor, M.; Schwartz, H. eds. Bean production problems in the tropics. Cali, Colombia. CIAT. p.195-209.

Gálvez, G., Mora, B., Pastor, M. 1994. La mustia hilachosa In: Problemas de pudrición del frijol en los trópicos. CIAT. Cali. Colombia. p. 227.

Gao, F., Dai, C. y Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African Journal of Microbiology Research, 4(13), p.134-135.

Garveba, P., Van Veen, J y Van Elsas, J. 2004. Microbial diversity in soil: Selección of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* P. 243-270

Gepts, P. 1988. Provisional linkage map of common bean. *Annu Rep Bean Improv Coop* 31:20–25 Gepts P (1990) Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* beans. p. 28–38.

Gepts, P., Bliss, F. 1984. Enhanced available methionine concentration associated with higher phaseolin levels in common bean seeds. *Theor Appl* .p.47–53

Gepts, P., Bliss, F. 1985. F1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. *J Hered* .p. 447–450

Gepts, P., Bliss, F. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. p.469–478.

Gepts, P., Osborn, T., Rashka, K., Bliss, F. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. P.451–468

Gepts, P., Osborn, T., Rashka, K and Bliss, F. 1986. Phaseolin –protein variability in wild forms and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication. p.451-486.

Gómez, 2017. Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolanos. p17.

González C.1998. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. Instituto de Investigación Agropecuaria. Cuba. p. 59-65.

Harrison, A. 1983. Relationship between intensity of phosphatase activity and physico - chemical properties in woodland soils. p.93-99.

Häussling, M y Marschner, H. 1989. Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphates activity in the rhizosphere of 80-year-old Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees. *Biol. Fertil. Soils*. p.128-133.

Hernández, D., Díaz, M, Quiñones, R., Bermúdez, R., González, N., Herrera, L. 2018. Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales.

Herre, E., Mejía, L., Kyllö, D., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A y Van Bael, S. 2007. Ecological implication of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*. p. 550-558.

Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R y Puckhaber, L. 1998. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathol.*p. 248-252.

Howell, C., Stipanovic, R. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*–induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathology* 85 .p.469–472.

Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, M., Abramsky, I., Chet y Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.* Contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agron. Colomb.*p.451-458.

<http://www.foodnewlatam.com/biotecnolog%C3%ADa/59-ingredientes/2707-la-composici%C3%B3n-qu%C3%ADmica-de-tres-variedades-de-frijoles.html>

<http://www.panamaagro.com/noticias/agricultura/2150-en-apuros-productores-de-frijoles-en-panama.html>.

Huang,Q., Skindo, H. y Goh, T. 1995. Adsorption, activities and kinetics of acid phosphatase as influenced by montmorillonite with different interlayer material.p. 27-278.

Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kuhn asociado con la papa en Mérida, Venezuela Inci v.26n7Caracas.

INCAP.2007. Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica. /INCAP/Menchu, MT(ed); Mendez, H(ed). : /OPS, Segunda edición.

INIFAP. 2005. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Informes anuales, programas de leguminosas .p.22 -23.

Jaques, M., Kinkel, L., Moris, C. 1994. Population sizes, immigration and the growth of epiphytic bacterial on leaves of different ages position of field-growth endive (*Cichorium endivia* var. *Latifolia*). *Applied and Environmental Microbiology.*p. 61.

Juma, N y Tabatabai, M. 1978. Distribution of phosphomonoesterases in soil.p. 101-108.

Kandeler, E y Eder, G. 1993. Effect of cattle slurry in grassland on microbial biomass and on activities of various enzymes.p. 249-254.

Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M., Khan, S y Ahmad, A. (2007). Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT.) R. Br. *Pak. Journal Botanical*, 39 (6).p.233-239. Recuperado de [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39\(6\)/PJB39\(6\)2233.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39(6)/PJB39(6)2233.pdf)

Kumar, D., y Hyde, K. 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity.*p. 69-90. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/17-6.pdf>.

Lewis, J., Papavizas, G. 1984. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. P. 74, 1244.

Lindow, S., Brandl, M. 2003. Minireview: Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. P. 187–188.

Lloyd, J. y Taylor, A. 1994. On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* .p. 315-323.

López, R. 2011. Biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies solanáceas: (*Solanum lycopersicon*, L.) y *Datura* spp. (Tomate y toloache. Instituto Politecnico Nacional.

Lorenzo, E. 2012. Manejo integrado de la mustia hilachosa en el cultivo de frijol poroto (*Phaseolus vulgaris* L.).

Lorenzo, E., González, F. 1994. Efecto de la densidad de la cobertura sobre la severidad de la mustia hilachosa en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Caisán. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Panamá, IDIAP. 9 p.

Lorenzo, E; González, F. 1995. Efecto de los fungicidas sobre velocidad de desarrollo de la mustia hilachosa bajo dos sistemas de labranzas. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Panamá, IDIAP. p.10.

Lorenzo, E; González, F. 1995. Efecto del tratamiento químico en la severidad de la mustia hilachosa en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en labranza de conservación bajo dos coberturas. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Panamá, IDIAP.p 8.

Lumsden, R., Lewis, J., García, E. y Frías, T. 1981. Suppression of pathogens in soils from traditional Mexican agricultural systems. *Phytopathology* .p. 891-892.

Makboul, H y Ottow, J. 1979. Alkaline phosphatase activity and Michaelis constant in the presence of different clay minerals.p.129-135.

Malinowski, D., Zuo, H., Belesky, D and G.A. ALLOUSH. 2005. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. *Plant and Soil* .p. 1–12

Martínez, L., Bernsten, R., Zamora, M. 2004. Estrategias de mercado para el frijol Centroamericano. *Agronomía Mesoamericana*.p.121-130.

Mavrodi, D., Blankenfeldt, W. y Thomashow, L. 2006. Phenazine. Compounds in *Pseudomonas fluorescent* and *Pseudomonas* spp. Biosynthesis and Regulation. *Annual Review of Phytopathology*.p. 417-445.

Mehrotra, A. 1998. Fungiagents of biological control in biocontrol of plant diseases. Mehrotra R., Aneja K., Gupta A., A. A. Boca Ratón: C.R.C. Press.

Méndez, M. 2003. Principales factores ambientales, antibiosis y acción del basidiomiceto 4-B en el biodeterioro de la madera de *Eucalyptus globulus*. 81 p. Tesis Ingeniería Forestal. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales, Santiago, Chile.

Meza, C., Fernández, R., Valero, N., Gámez, R y Páez, A. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Col. de Biotec.p.35– 43.

Miller, J. 1986. Toxic metabolites of epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. In F. & Van den Heuvel Microbiology of the phyllosphere. Cambridge University Press 1:

MINAGRI. 2009. Listado oficial de variedades comerciales. MINAGRI, La Habana, Cuba.

Ministerio de Desarrollo Agropecuario.2012. Dirección de agricultura, tema: cultivo de poroto.2012.PDF, <http://www.mida.gob.pa/upload/documentos/poroto.pdf>

Morales, R., Ríos, D., Muñoz, J., Concepción, R. 2007. Desarrollo y uso de bioproductos para el control de nematodos y sigatoka negra en plantaciones de plátano y banano: reporte final Proyecto IDIAP – FONTA- GRO. s.e. p.20.

Morillo E., Sánchez-Trujillo, M.A., Villaverde, J., Madrid, F. y Undabeytia, T. 2014. Effect of contact time and the use of hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the removal of fluorene and fluoranthene from contaminated soils. Science of the total environment .p.144–154.

National Academy of Sciences. 1980. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México.p. 223.

Nerey, Y., Van Beneden, S., Franca, S., Jiménez, A., Cupull, R. 2010. Influence of soil type and indigenous pathogenic fungi on bean hypocotyls rot caused by *Rhizoctonia solani* AG4 HGI in Cuba. *Soil Biology & Biochemistry*. p. 797-803.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. 2005. En sitio web: <http://www.fao.stat.org> [consultado el 7de agosto de 2018].

Orietta, F y Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).p. 96-100.

Paolini, J. 2018. Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolano.p. 17-19.

Parmeter, J.1970. *Rhizoctonia solani*: Biology and pathology. Univ. of California Press, Berkeley.

Pastor-C., M. 1985. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: Frijol: investigación y producción. CIAT p. 186.

Patiño, C., Sánchez .2012. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* kunth). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 10 No. 2 (177 - 187) Julio - Diciembre 2012.p.180

Paul, B.1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiosum*. FEMS Microbiology Letters .p.25–30.

Perucci, P y Scarponi, L. 1985. Effect of different treatments with crop residues on soil phosphatase activity.p.111-115

Perucci, P., Scarponi, L. y Businelli, M. 1984. Enzyme activities in a clay-loam soil amended with various crop residues.p. 345-351.

Pinheiro, C., Baeta, N., Pereira, A., Domínguez, H., Ricardo, C. 2007 .Mineral elements correlations in a Portugese germplasm collection of *Phaseolus vulgaris*. Integrating Legume Biology for Sustainable Agricultura. 6 European Conference on Grain Legumes. 12-16 noviembre 2007, Lisboa, Portugal, p. 125-126.

Poinar, G., Buckley, R. 2007. Evidence of mycoparasitism and hypermycoparasitism in Early Cretaceous amber. Mycological Research.p. 503–506.

Qingmiao, Z., Xiyang, W., Jiawen, W.2012. Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspense*.

Rabha , A., Naglot. A., Sharma, G., Gogoi, H., Veer, V. 2014. In Vitro Evaluation of Antagonism of Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Against Potent Fungal Pathogens of *Camellia sinensis*.p.34.

Ramírez, M. 2014. Bases para el manejo integrado de hongos fitopatógenos del suelo en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Agricultura Sostenible, Mención Sanidad Vegetal. UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Ramos, E y Zúñiga, D. 2007.efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio.p.124-128.

Rangel, H. 2014. Manual de antibiogramas, para medir cepas bacterianas. <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/>.

Richter, H. y Schneider, R. 1953. Studies on morphological and biological differentiation of *Rhizoctonia solani* K. Phytopathol .p.167-226

Robin, C., Anziani, C and Cortesi, P. 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* .p. 730–737.

Rodríguez, E., Lorenzo, E. 2009. Manual técnico: tecnologías para el manejo integrado del cultivo de frijol poroto (*Phaseolus vulgaris L.*) en Panamá. s.e.Panamá, PA. IDIAP.p. 32.

Rodríguez, E., Lorenzo, E., Acosta, M., González, F., Mora, B., Godoy, G. 1999. Manejo de la mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris* (Frank)) en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) (en línea). *Agronomía Mesoamericana* .p.99-108.

Rodríguez, E., Lorenzo, E., De Gracia, R., González, G., González, F. 1997. Manual técnico del manejo integrado del frijol común o poroto (*Phaseolus vulgaris L.*) en el sistema de mínima labranza. s.e. Panamá, PA. IDIAP.p. 75.

Royse, D y Ries, S. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*.p.603-607.

Rubio, M., Hernández, E., Aguirre R., Poutou, P. 2008. Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae* .*Revista MVZ Córdoba*.p.1157-1169.

Saffigna, P., Powlson, D., Brookes, P and Thomas, G. 1989. Influence of sorghum residues and tillage on soil organic matter and soil microbial biomass in an Australian vertisol. *Soil Biol. Biochem.* p. 759-765.

Sanchez-González, A., López-Mata., Vibrans, H. 2006. Composition and geographic distribution patterns of the first forest flora of Cerro Tlatloc, Mexico TT-Composición y patrones de distribución geográfica de la flora del bosque de oyamel del cerro tlatloc, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*.p.67-78.

Sempere, F., Santamarina, M. 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berck & Broowe) Petch. by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalium* Curve & Thom. *International Journal of Food Microbiology*.p. 35–43.

Shankar, J., Singh. 2013. “Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential Microbes for Sustainable Agriculture”. *Resonance*.p. 275-281.

Sinclair, W., Lyon, H., Johnson, W. 1987. Diseases of trees and shrubs. New York, USA. Cornell University Press. p.512.

Skujins J. 1976. Extracellular enzymes in soil. *Crit. Rev. Microbiol.*p. 383-421.

Srivastava, S y Singh, J. 1991. Microbial C, N and P in dry tropical forest soils: effects of alternate land-uses and nutrient flux. *Soil. Biol. Biochem.*p.117-124.

- Suárez, C., Fernández, R., Valero, N., Gómez, R., Páez, A. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista colombiana de Biotecnología.p.35-43.
- Swarthout, D., HARPER, E., Judd, S., Gonthier, D., Shyne, R., Stowe, T and Bultman, T. 2009. Measures of leaf-level water use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. Environmental and Experimental Botany.p. 88– 93.
- Tolosa, D., Lizarazo, L. 2013. Microbial populations associated with the rhizosphere plants of cape Gaeseberry (*Physalis peruviana* L.).p.32.
- Tovar, J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de *Trichoderma spp.* frente al hongo fitopatógeno *R. solani*. p.31.
- Trasar-Cepeda, M and Gil-Sotres, F. 1987. Phosphatase activity in acid high organic matter soils in Galicia (NW Spain). Soil Biol. Biochem.p.281-287.
- Vásquez, M., César, S., Azcón, R., Barea, J. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. Applied Soil Ecology. p.261-272.
- Vasseur, V., M. Van Montagu y Goldman, G. 1995. *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. Microbiol. p. 147, 767-774.
- Venkayasubbaia, P., Safeeulla., K. 2008. *Aspergillus niger* for biological control of *Rhizoctonia solani* on coffee seedlings.p.401-406. Published online: 13 Nov 2008.
- Vivanco, M., Zamar, M., Sosa, M. 2011. Clave ilustrada para la identificación de larvas y adultos de trips (Insecta: *Thysanoptera*) presentes en el cultivo de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en Jujuy y Salta (Argentina).
- Waksman, S.1927. Principles of soil microbiology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. p.897.
- Waksman, S.1944. Microbial antagonisms and antibiotic substances. The Commonwealth Foundation, New York.
- Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 3 th edition. CRC press.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology.p. 837–845.
- Weller, D.; Saettler, A. 1980. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans.p.500-506.
- West, A., Sparling, G., Speir y Wood, J. 1988. Comparison of microbial C, N-flush and ATP, and certain enzyme activities of different textured soils.p.213.

Whipps, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* .p.487–511.

Wisniewski, M.and Wilson, C. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *HortScience* .p.94-98.

Zhou, T., Northover, J., and Schneider, K.1999. Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*.p.375-381.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexos I

Tabla 1. Valores de respiración microbiana de las plantas de frijol en sus tres estados fenológicos.

Fase fenológica	Respiración microbiana (mg CO₂.100_{g-1s.s})
Vegetativa	63.36
Floración	58.7
Fructificación	54.53

Tabla 2. Valores obtenidos de la actividad de la enzima deshidrogenasa en los suelos de las plantas de frijol.

Fase fenológica	Absorbancia (A_{485nm})
Vegetativa	0.480
Floración	0.905
Fructificación	0.784

Anexos II

Tabla 3. Tabla de las mediciones de los enfrentamientos antagonicos frente a *T. cucumeris*.

DÍAS(CM)	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1.6	3.3	4.5	5.7	6.1	6.2	6.2	6.2
B	1.2	2.5	4.0	5.2	5.9	6.3	6.3	6.3

Medición del patógeno *T.cucumeris* creciendo en un plato solo, por días.

Replica	Código de bacteria	D1(cm)	D2(cm)	D3(cm)	D4(cm)	D5(cm)	D6(cm)	D7(cm)
1	ENVB1	0.5		3.6	4.6	6.2	6.2	6.2
2	ENVB1	0.8		4.1	5.9	6.2	6.2	6.2
3	ENVB1	0.8		4.3	4.5	6.2	6.2	6.2
1	ENVM21	0.4		3.9	5.8	6.2	6.2	6.2
2	ENVM21	0.6		4	5.1	6.2	6.2	6.2
3	ENVM21	0.5		4.2	5.2	6.2	6.2	6.2
1	ENVM29	0	0.7	2.1	2.2		2.6	2.6
2	ENVM29	0	0.8	2	2.5		2.5	2.5
3	ENVM29	0	0.4	1.2	1.5		1.5	1.7
1	ENVA8	0.6		3.4	3.8	3.7		4.5
2	ENVA8	0.5		3.7	4.3	6.2		6.2
3	ENVA8	0.2		2.7	3.2	3.5		4.2
1	EPV6	0.5		1.8	3.9	3.9	3.9	3.9
2	EPV6	0.5		3.6	3.8	4	3.9	3.9
3	EPV6	C	C	C	C	C	C	C
1	EPV13	1		1.8	2.3	3.2		3.3
2	EPV13	0.6		3.3	4.2	4.3		4.5
3	EPV13	0.6		1.1	1.3	3.1		3.5
1	TV2	0.5	2	3.6	4.9			
2	TV2	0.5	2.2	4.1	5.3			
3	TV2	1.5	1.8	3.5	4.5			
1	TV5	0.7		2.4	4	4.6		4.6
2	TV5	1		2.6	4.3	4.6		4.6
3	TV5	1.7		2.3	3.9	4.5		4.5
1	TV7	0.9		2.4	3.9	5.7		
2	TV7	0.5		2	3.6	5.2		

Replica	Código de bacteria	D1(cm)	D2(cm)	D3(cm)	D4(cm)	D5(cm)	D6(cm)	D7(cm)
3	TV7	0.9		2.4	4.1	4.9		
1	TV11	0.9	3	3.2	3			3.5
2	TV11	0.6	2.9	3.3	3.4			3.4
3	TV11	0.8	2.9	3.6	3.7			3.7
1	TV17	0.4	2.1	3.9	4.7			5.8
2	TV17	0.5	2.4	4.2	4.4			5.9
3	TV17	0.4	2	3.6	4.2			5.8
1	TV18	0.9	2.2	4	4.7			6.2
2	TV18	1	2.2	4.1	5.1			6.2
3	TV18	0.5	2	3.6	4.7			6.2
1	RV4	0.5		3.3	4	4.2		4.2
2	RV4	0.6		3.4	3.9	4.5		4.2
3	RV4	0.5		3.3	4	4.2		4.2
1	RV10	0.5		3	3.9	4.1		4.1
2	RV10	0.5		1.7	1.9	2.1		2.1
3	RV10	0.8		1.8	2.9	3.3		3.4
1	TRV1	0.8	2.2	3.3	3.6		6.3	6.3
2	TRV1	0.6	1.4	1.5	1.5		1.5	1.5
3	TRV1	0.7	2.1	3.1	3.9		4.3	4.3
1	TRV1AP4	0.5	1.3	2.5	3.2		3.2	3.3
2	TRV1AP4	2.1	2	2.9	3		3	3
3	TRV1AP4	1.6	2.9	2.7	2.9		3	3
1	TRV2-3	0.7		3.5	4.3	4.4		4.4
2	TRV2-3	0.4		3.2	2.6	2.8		2.8
3	TRV2-3	0.6		3.3	3.8	3.9		3.9
1	TRV2	0.4	0.9	2.9	3.6			6.2
2	TRV2	0.5	2.2	3.9	4.6			5.8
3	TRV2	1	2.1	3.7	4.2			5.8
1	TRV3	0.9	2.6	4.4	6.2			6.25
3	TRV3	0.9	2.5	4.5	6.2			6.25
1	TRV6	0.3	3.2	3.5	3.6			6.2
2	TRV6	0.5	3	3.5	4			6.2
3	TRV6	0.4	2.9	2.9	3.6			6.2
1	TRV8	0.4	1.7	3.2	4.4			6.2

Replica	Código de bacteria	D1(cm)	D2(cm)	D3(cm)	D4(cm)	D5(cm)	D6(cm)	D7(cm)
2	TRV8	1	2.5	3.9	4.6			6.2
3	TRV8	1.5	2.2	3.6	4.8			6.2
1	TRV13	0.4	3	4.2	5.1			6.2
2	TRV13	0.3	2.7	3.5	4.1			6.2
3	TRV13	0.8	2.1	3.6	4.4			6.2
1	TRV14	0.9	2.3	2.7	2.7		3	3.1
2	TRV14	0.9	1.7	1.9	2		2	2.2
3	TRV14	0.9	2.1	3.1	3.1		3.1	3.2
1	TRV15	0.7	2	3.3	3.7		3.7	3.6
2	TRV15	0.7	2.1	3	4		6.3	6.3
3	TRV15	0.9	2.2	3.1	3.2		3.4	6.3
1	TRV16	0.6		3.7	4.3	4.4		6.2
2	TRV16	0.6		3.7	4	4.2		6.2
3	TRV16	0.8		3.6	4.2	4.6		6.2
1	FLENB8	0.7	2.2	3.9	4.9			6.2
2	FLENB8	0.4	1.9	4.1	3.3			4.5
3	FLENB8	0.9	2.2	3.8	3.6			5
1	FLENM15	0.6		3.5	4.5	4.3		4.1
2	FLENM15	0.6		4	4.2	4.5		2.2
3	FLENM15	0.6		3.8	3.7	4		3.9
1	FLENA20	0.5		3	3.5	4		6.2
2	FLENA20	0.3		3	4.4	5.3		6.2
3	FLENA20	0.4		3.2	3.5	3.8		6.2
1	FLEP2	0.6	1.8	3.4	4.3			6.2
2	FLEP2	0.6	2.4	3.5	4.3			6.2
3	FLEP2	1	2.4	3.6	4.5			6.2
1	FLEP3	0.6		4.3	6	5.2		6.2
2	FLEP3	1		4.2	5.2	5		6.2
3	FLEP3	0.3		4.1	5.4	3.2		6.2
2	FLEP5	0.9	2.2	4.5	6.2	6.2	6.2	6.2
3	FLEP5	0.8	2.2	4.3	6.2	6.2	6.2	6.2
1	FLEP7	0.6	2.3	4	5.2			6.2
2	FLEP7	1	3.2	4.5	5			6.2
3	FLEP7	2.2	1.9	2.3	3.3			6.2

Replica	Código de bacteria	D1(cm)	D2(cm)	D3(cm)	D4(cm)	D5(cm)	D6(cm)	D7(cm)
1	FLEP9	0.9	2.4	4	4.9			6.2
2	FLEP9	0.5	2.2	3.8	4.9			6.2
3	FLEP9	0.4	2.1	3.3	4.3			6.2
1	FLEP14	0.5		3	3.7	4.5	6.2	
2	FLEP14	0.4		3.3	4.2	4.7	6.2	
3	FLEP14	0.4		3.3	4.2	4.8	6.2	
1	FLEP19	0.5		3.6	4	4.2	4.2	
2	FLEP19	0.6		3.9	4.3	4.2	4.2	
3	FLEP19	0.4		3.7	4.2	4.7	4.7	
1	TFL4	0.4		3.2	4.2	6.2	6.2	
2	TFL4	0.3		3.5	4.8	6.2	6.2	
3	TFL4	0		1.9	3.4	4.6	6.2	
1	TFL7	0.3		3	3.4	3.4	3.4	
2	TFL7	0.3		3.2	3.5	3.5	3.5	
3	TFL7	0.5		3.9	4	4	4	
1	TFL14	0.5		3.6	4.3	5.7	6.2	6.2
2	TFL14	0.8		3.8	5.1	6.2	6.2	6.2
3	TFL14	0.8		3.3	4.3	6.2	6.2	6.2
1	TFL19	0.5		3.6	4.6	5.7		
2	TFL19	0.8		3.6	5	6.2		
3	TFL19	0.8		3.7	4.9	6.2		
1	TFL20	0.5	2.3	3.7	5.2			6.2
2	TFL20	0.9	2.3	3.7	5			6.2
3	TFL20	2.5	2.5	4	5.1			6.2
1	RFL3	0.4	2.1	3.8	4.4			
2	RFL3	0.3	2	3.8	4.4			
3	RFL3	0.4	1.9	3.6	4.2			
1	RFL4	1.1	1.2	2.4	2.6		2.7	2.2
2	RFL4	1.9	2	3.4	3.8		3.8	3.8
1	RFL9	0.7		3.6	4.2	4.5		6.2
2	RFL9	0.8		3.7	4.4	5		6.2
3	RFL9	0.6		3.6	4.1	4.5		6.2
1	RFL17	1.7	2.1	4.1	5.7	6.2	6.2	6.2
2	RFL17	0.5	2	3.9	5.8	6.2	6.2	6.2

Replica	Código de bacteria	D1(cm)	D2(cm)	D3(cm)	D4(cm)	D5(cm)	D6(cm)	D7(cm)
3	RFL17	0.9	2.1	4.3	6.2	6.2	6.2	6.2
1	RFL18	0.5		3.7	4.1	4.2		
2	RFL18	0.5		3.2	3.9	4		
3	RFL18	0.4		3.5	4	4		
1	TRFL2	0.8		2.7	2.6	2.7	2.9	2.9
2	TRFL2	0.8		2.7	2.6	2.7	2.9	2.9
3	TRFL2	1		2.1	3.3	3.3	3.3	3.3
1	TRFL4	0.9	0.8	2.3	2.9	3.2		3.1
2	TRFL4	0.9	1.5	2.9	3.2	3.5		3.5
3	TRFL4	0.9	0.4	1.9	2.8	2.9		2.9
1	TRFL6	0.4		3.9	5.2	6.2		6.2
2	TRFL6	0.5		3.6	4.5	4.5		6.2
3	TRFL6	0.5		4	5.2	5.2		6.2
1	TRFL9	0.5	2.1	3.5	4.5	6.2	6.2	6.2
2	TRFL9	1.5	2.3	3.3	4.5	6.2	6.2	6.2
3	TRFL9	0.5	1.7	3.5	4.7	6.2	6.2	6.2
1	FRENB6	0.6	1.7	2	2.6		3	6.2
2	FRENB6	1	1.9	2.1	2.8		3.2	6.2
3	FRENB6	0.8	2	3	3.3		6.2	6.2
1	FRENB16	0.8		3.5	3.9	6.2	6.2	6.2
2	FRENB16	0.7		3.5	3.6	6.2	6.2	6.2
3	FRENB16	0.6		3.2	4.1	6.2	6.2	6.2
1	FRENB8	0.9		2.6	4	5.4	6.2	6.2
2	FRENB8	0.9		1.7	3	4	6.2	6.2
3	FRENB8	0.9		2.6	4	5.4	6.2	6.2
1	FRENM10	0.5	2.1	3.5	4.6	6.2	6.2	6.2
2	FRENM10	0.9	2.5	3.9	4.9	6.2	6.2	6.2
3	FRENM10	0.9	2.5	3.9	4.9	4.8	6.2	6.2
1	FRENM16	0.8		3.5	3.9	5	6.2	6.2
3	FRENM16	0.6		3.2	4.1	5.2	6.2	6.2
1	FRENM19	0.9	0.9	2.2	3.1		4	4.3
2	FRENM19	0.9	0.9	2.2	2.4		2.8	3.1
3	FRENM19	0.2	1.2	2	2		2.5	3
1	FREP*	0.7		3.7	4.5	4.1	4.2	

Replica	Código de bacteria	D1(cm)	D2(cm)	D3(cm)	D4(cm)	D5(cm)	D6(cm)	D7(cm)
2	FREP*	0.5		3.2	3.7	3.6	4	
3	FREP*	0.7		3.4	4	3.9	3.8	
1	FREP5	0.2	2	4	6.6	6.2	6.2	6.2
2	FREP5	0.9	2.2	4.5	6.2	6.2	6.2	6.2
3	FREP5	0.8	2.2	4.3	6.2	6.2	6.2	6.2
1	FREP9	0.2	1.3	1.3	1.3		1.2	1.4
2	FREP9	0	0.4	0.4	0.4		0.4	0.4
3	FREP9	0	0.6	0.6	0.7		0.5	0.5

Tabla 4. Mediciones antagonicas de los aislamientos fúngicos frente al patógeno *T. cucumeris*.

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
1	vegetativa	AEV25	2.1	5.4	6.2
2	vegetativa	AEV25	2.7	5.4	6.2
3	vegetativa	AEV25	2.5	5.4	5.6
1	vegetativa	AEV30	1.8	3.2	6.2
2	vegetativa	AEV30	1.6	3	6
3	vegetativa	AEV30	1.9	3.5	6.2
1	vegetativa	AEV31	2.4	2.5	3.5
2	vegetativa	AEV31	2.1	3	3.5
3	vegetativa	AEV31	2.1	2.9	3.8
1	vegetativa	AEV1	1.6	2.4	4.6
2	vegetativa	AEV1	2	2.7	4.6
3	vegetativa	AEV1	2	2.9	4.6
1	vegetativa	BEV5	2.9	3.3	3.3
2	vegetativa	BEV5	2.3	3	3.2
3	vegetativa	BEV5	2.5	3.4	3.5
1	vegetativa	BEV7	2.2	3.2	6
2	vegetativa	BEV7	2.3	3.1	3.1
3	vegetativa	BEV7	2.4	3.1	6.1
1	vegetativa	BEV17	2.1	2.8	3.2

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
2	vegetativa	BEV17	2.1	2.8	3.2
3	vegetativa	BEV17	2.1	2.8	3.2
1	vegetativa	BEV18	2.6	4	4.9
2	vegetativa	BEV18	2.6	3.8	4
3	vegetativa	BEV18	2.4	3.7	4.1
1	vegetativa	BEVZ	1.6	4	6.2
2	vegetativa	BEVZ	1.5	3.5	6.2
3	vegetativa	BEVZ	1.6	4	6.2
1	vegetativa	EPVPONE	2.2	2.9	3.5
2	vegetativa	EPVPONE	1.3	3.7	5.9
3	vegetativa	EPVPONE	1.3	5.2	6.2
1	vegetativa	TV2P2C	2.7		5.1
2	vegetativa	TV2P2C	2.6		3.5
3	vegetativa	TV2P2C	2.7		3.2
1	vegetativa	TVP2A	1.9		6.2
2	vegetativa	TVP2A	1.7		6.2
3	vegetativa	TVP2A	1.4		6.2
1	vegetativa	TV1 10-6	2.9	3.8	
2	vegetativa	TV1 10-6	2.6	2.6	
3	vegetativa	TV1 10-6	Sc	sc	Sc
1	vegetativa	TV4b	1.9	4	6.2
2	vegetativa	TV4b	1.9	4	6.2
3	vegetativa	TV4b	1.7	3.2	6.2
1	vegetativa	TRVP110-3	1.7	2.4	6.2
2	vegetativa	TRVP110-3	1.5	2.6	6.2
3	vegetativa	TRVP110-3	1	2.4	6.2
1	vegetativa	TRV3B 10-1	1.5	2.7	6.2
2	vegetativa	TRV3B 10-1	1.5	2.6	6
3	vegetativa	TRV3B 10-1	1.5	2.7	6.1
2	vegetativa	TRV1D10-4	2	4.2	6.2
3	vegetativa	TRV1D10-4	2	4	6.2
1	vegetativa	RV10-4	2.4	3.6	6.2
2	vegetativa	RV10-4	2.5	3.6	5.8
3	vegetativa	RV10-4	2.6	3.5	6.2

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
1	vegetativa	RV10-5	2.5	3.4	6.2
2	vegetativa	RV10-5	2.5	3.1	6.2
3	vegetativa	RV10-5	1.4	3.7	6.2
1	Floración	EPFL10-3PONE	2.2	2.9	3.5
2	Floración	EPFL10-3PONE	1.3	3.7	5.9
3	Floración	EPFL10-3PONE	1.3	3.5	6.2
1	Floración	EPFL10-4P1	0.7	2.1	6
2	Floración	EPFL10-4P1	0.7	2.1	6
3	Floración	EPFL10-4P1	0.3	2.8	6
1	Floración	EPFL10-4P3	2.4	3	5.2
2	Floración	EPFL10-4P3	2.5	4	5.2
3	Floración	EPFL10-4P3	0.6	3.6	5.2
1	Floración	EPFL10-4 10	2.4	3.8	6.2
2	Floración	EPFL10-4 10	2.1	3.6	6.2
3	Floración	EPFL10-4 10	2.1	3.7	6.2
1	Floración	EPFL10-5 3/5P2	1.7	4.5	6.2
2	Floración	EPFL10-5 3/5P2	1.7	4.5	6.2
3	Floración	EPFL10-5 3/5P2	1.7	4.5	6.2
1	Floración	EPFL10-5 P1	1.5	2.5	5.5
2	Floración	EPFL10-5 P1	0.7	3.5	5.5
3	Floración	EPFL10-5 P1	1.5	2.6	5.5
1	Floración	EPFL10-52B	2.9	4.8	6.2
2	Floración	EPFL10-52B	2.9	4.3	6.2
3	Floración	EPFL10-52B	2.9	4	6.2
1	Floración	EPFL10-5P2	2	3	3.2
2	Floración	EPFL10-5P2	2.1	3.6	4.1
3	Floración	EPFL10-5P2	2.5	3.6	4
1	Floración	EPFL10-5P6	2.7	4.5	6.2
2	Floración	EPFL10-5P6	2.7	4.8	6.2
1	Floración	EPFL10-6P3	2	3.5	6
2	Floración	EPFL10-6P3	1.7	2	6
3	Floración	EPFL10-6P3	1.7	2.3	6
1	Floración	BENFLPLAY	1.8	5.6	6.2
2	Floración	BENFLPLAY	1.9	4	6.2

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
3	Floración	BENFLPLAY	1.8	4.6	6.2
1	Floración	BENFLP2	2	3.6	4
2	Floración	BENFLP2	2	3.2	4.8
3	Floración	BENFLP2	2	3.2	2.7
1	Floración	TFL(3)-1(2)	2	3.2	4.2
2	Floración	TFL(3)-1(2)	2	2.4	4.2
3	Floración	TFL(3)-1(2)	2	3.2	4.5
1	Floración	TFL(4)-3A	2.2	3.2	6.1
2	Floración	TFL(4)-3 A	2.3	2.6	6.1
3	Floración	TFL(4)-3 A	2.1	2.9	6.1
1	Floración	TFL(1)-1A	0.7	4.4	3.7
2	Floración	TFL(1)-1A	1	3	4.4
3	Floración	TFL(1)-1A	0.7	4	6
1	Floración	TFL(4)-2	2.7	4.9	6.2
2	Floración	TFL(4)-2	2.7	5.2	6.2
3	Floración	TFL(4)-2	2.6	4.4	6.2
1	Floración	TFL(7)-2	1.2	4	6.2
2	Floración	TFL(7)-2	1.8	1.8	3.3
3	Floración	TFL(7)-2	1.1	3.7	6.2
1	Floración	TFL(1)A10-4(2)	2.7	4	6.1
2	Floración	TFL(1)A10-4(2)	2.7	3.8	6.1
3	Floración	TFL(1)A10-4(2)	2.3	3.4	6.1
1	Floración	TFL(4)-3A	2.2	3.2	6.1
2	Floración	TFL(4)-3 A	2.3	2.6	6.1
3	Floración	TFL(4)-3 A	2.1	2.9	6.1
1	Floración	TFL(1)- 1(2)	0.7	2.1	4.3
2	Floración	TFL(1)- 1(2)	0.4	2.3	4.3
3	Floración	TFL(1)- 1(2)	0.3	2.5	4.5
1	Floración	RFL10-1P7	0.7	4.4	6.2
3	Floración	RFL10-1P7	0.7	4	6
1	Floración	RFL10-2P2	0.4	2.2	4.2
2	Floración	RFL10-2P2	0.4	2.6	4.2
3	Floración	RFL10-2P2	0.3	1.3	4.2
1	Floración	RFL10-3P10	2.7	7.1	6.2

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
2	Floración	RFL10-3P10	2.6	4.05	6.2
3	Floración	RFL10-3P10	2.8	4.45	6.2
1	Floración	RFL410-4P4	2.8	5.45	6.2
2	Floración	RFL410-4P4	2.45	5.45	6.2
3	Floración	RFL410-4P4	2.4	5.45	6.2
1	Floración	RFL10-5P6	1.8	5.45	6.2
2	Floración	RFL10-5P6	2.5	5.45	6.2
3	Floración	RFL10-5P6	2.8	5.45	6.2
1	Floración	RFL10-6P6	0.7	3.1	6.2
2	Floración	RFL10-6P6	0.5	3.1	6.2
3	Floración	RFL10-6P6	0.9	3.1	6.2
1	Floración	TRFL10-3P2	2.1	5.2	6.2
2	Floración	TRFL10-3P2	2.5	4	6.2
3	Floración	TRFL10-3P2	2.7	4.6	6.2
1	Floración	BENFLPLAY	1.8	5.3	6.2
2	Floración	BENFLPLAY	1.9	4	6.2
3	Floración	BENFLPLAY	1.8	4.6	6.2
1	Fructificación	BEFR(3)P2B	1	2.3	4.3
2	Fructificación	BEFR(3)P2B	1.2	3.2	4.3
3	Fructificación	BEFR(3)P2B	1	2.3	4.3
1	Fructificación	BEFR(1)P6A	1.2	1.5	6
2	Fructificación	BEFR(1)P6A	1	2.5	5.5
3	Fructificación	BEFR(1)P6A	1.5	1.5	5.5
1	Fructificación	BEFR(1)P6B	2.9	3	3.8
2	Fructificación	BEFR(1)P6B	0.3	4	6.2
3	Fructificación	BEFR(1)P6B	2.5	4	6.2
1	Fructificación	BEFR(1)P6C	2.8	4	5.8
2	Fructificación	BEFR(1)P6C	2	4	6
3	Fructificación	BEFR(1)P6C	2.5	4	6.1
2	Fructificación	BEFR(1)P6D	2.1	2.9	6.1
3	Fructificación	BEFR(1)P6D	2.1	3.2	6.1
1	Fructificación	BEFR(2)P4A	1.5	4.2	6
2	Fructificación	BEFR(2)P4A	1.7	3.5	6
3	Fructificación	BEFR(2)P4A	1.2	4	6

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
1	Fructificación	BEFR(1)PB	2.4	5.4	6.2
2	Fructificación	BEFR(1)PB	2.5	5	6.2
3	Fructificación	BEFR(1)PB	0.1	1.9	1.9
1	Fructificación	BEFRP2B	0.6	2.8	6.2
2	Fructificación	BEFRP2B	2.1	3.9	3.7
3	Fructificación	BEFRP2B	1.8	5	6.2
1	Fructificación	BEFR(3)P2A	1.5	1.8	5.3
2	Fructificación	BEFR(3)P2A	1.9	2.5	5.9
3	Fructificación	BEFR(3)P2A	2.1	3	6.2
1	Fructificación	BEFR(1)2P6C	1.9	2.9	
2	Fructificación	BEFR(1)2P6C	1.5	2.5	
3	Fructificación	BEFR(1)2P6C	2.6	1.7	
1	Fructificación	BEFR(3)2C	2.5	2.6	
2	Fructificación	BEFR(3)2C	2.7	3.4	
3	Fructificación	BEFR(3)2C	2.6	3.3	
1	Fructificación	MEFR(2)P8C	2.4	3	4.5
2	Fructificación	MEFR(2)P8C	2.2	3	4.5
3	Fructificación	MEFR(2)P8C	2.1	2.7	3.2
1	Fructificación	MEFR(1)P8C	0.6	3.2	6.2
2	Fructificación	MEFR(1)P8C	0.6	2.9	6.2
3	Fructificación	MEFR(1)P8C	0.3	3.4	6.2
1	Fructificación	MEFR(1)P7B	2.7	3.2	
2	Fructificación	MEFR(1)P7B	2.5	3.5	
3	Fructificación	MEFR(1)P7B	2.6	3.2	
1	Fructificación	MEFR(3)P3A	2.6		6.2
2	Fructificación	MEFR(3)P3A	2.4		5.8
3	Fructificación	MEFR(3)P3A	2.5		5.9
1	Fructificación	MEFR(3)PCB	0.3	2.9	2.3
2	Fructificación	MEFR(3)PCB	0.4	2.5	3
1	Fructificación	MEFR(1)P7A	0.3	4.1	6.2
2	Fructificación	MEFR(1)P7A	0.4	3.5	6.2
3	Fructificación	MEFR(1)P7A	0.1	4.8	6.2
1	Fructificación	MEFR(3)P3A	1	3	6.2
2	Fructificación	MEFR(3)P3A	1.1	5	6.2

Replicas	Fase fenológica	Código fúngico	Md2 (cm)	Md4 (cm)	Md7 (cm)
3	Fructificación	MEFR(3)P3A	0.9	3	6.2
1	Fructificación	AEFR(1)P1D	2.2	2.2	3.7
2	Fructificación	AEFR(1)P1D	0.1	2.9	4.5
3	Fructificación	AEFR(1)P1D	0.1	2.9	2.2
1	Fructificación	AEFR(3)P4A	0.6	2.3	2.6
2	Fructificación	AEFR(3)P4A	2.1	2.7	2.9
3	Fructificación	AEFR(3)P4A	2.1	2.5	2.5
1	Fructificación	AEFR(3)P4C	0.1	5.4	6.2
2	Fructificación	AEFR(3)P4C	2.4	5.4	6.2
3	Fructificación	AEFR(3)P4C	2.3	5.4	6.2
1	Fructificación	AEFR(2)P5D	2.2	2.9	6.2
2	Fructificación	AEFR(2)P5D	2.1	2.6	6.2
3	Fructificación	AEFR(2)P5D	2.1	2.5	6.2
1	Fructificación	AEFR(2)5B	0.7	3.9	4.2
2	Fructificación	AEFR(2)5B	0.7	3.9	4.5
3	Fructificación	AEFR(2)5B	0.9	3.9	4.3
1	Fructificación	AEFR(1) P1A	2.5		6.2
2	Fructificación	AEFR(1) P1A	1.9		6.2
3	Fructificación	AEFR(1) P1A	2.7		6.2
1	Fructificación	AEFR(1)P1C		2.3	3.6
2	Fructificación	AEFR(1)P1C		3.7	6.2
3	Fructificación	AEFR(1)P1C		2.9	5.9
1	Fructificación	EPFR(3)B10-2	2.6	3.3	5.4
2	Fructificación	EPFR(3)B10-2	1.5	3	5.8
3	Fructificación	EPFR(3)B10-2	2.6	3.4	5.4
1	Fructificación	EPFR(1)A10-5	2.1	3.1	5.8
2	Fructificación	EPFR(1)A10-5	2.3	3.1	5.8
3	Fructificación	EPFR(1)A10-5	2.4	3.1	5.8

Anexos III

Imágenes de las pruebas de enfrentamiento antagónico.

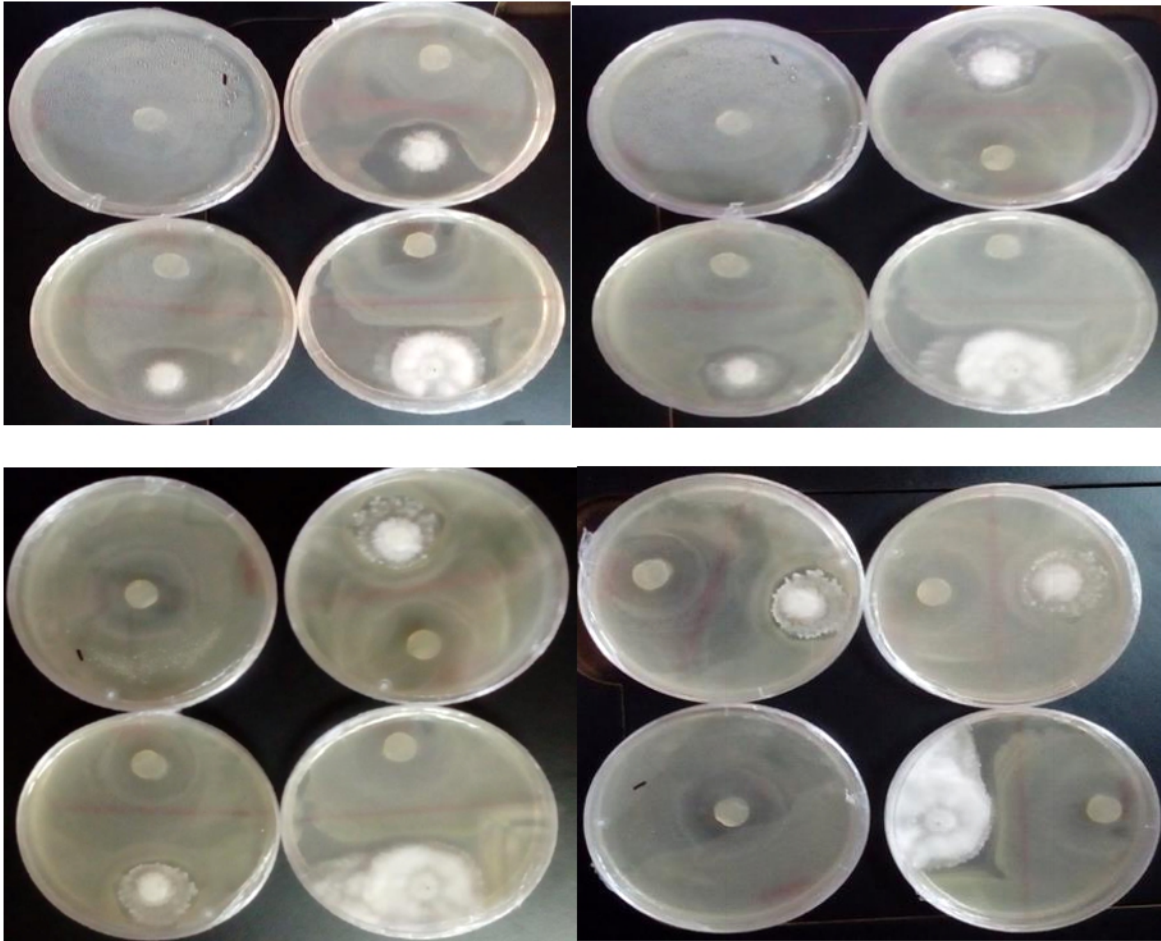


Figura 17. Imágenes del enfrentamiento positivo de la bacteria frep 9 frente a *T. cucumeris*.

Trf12

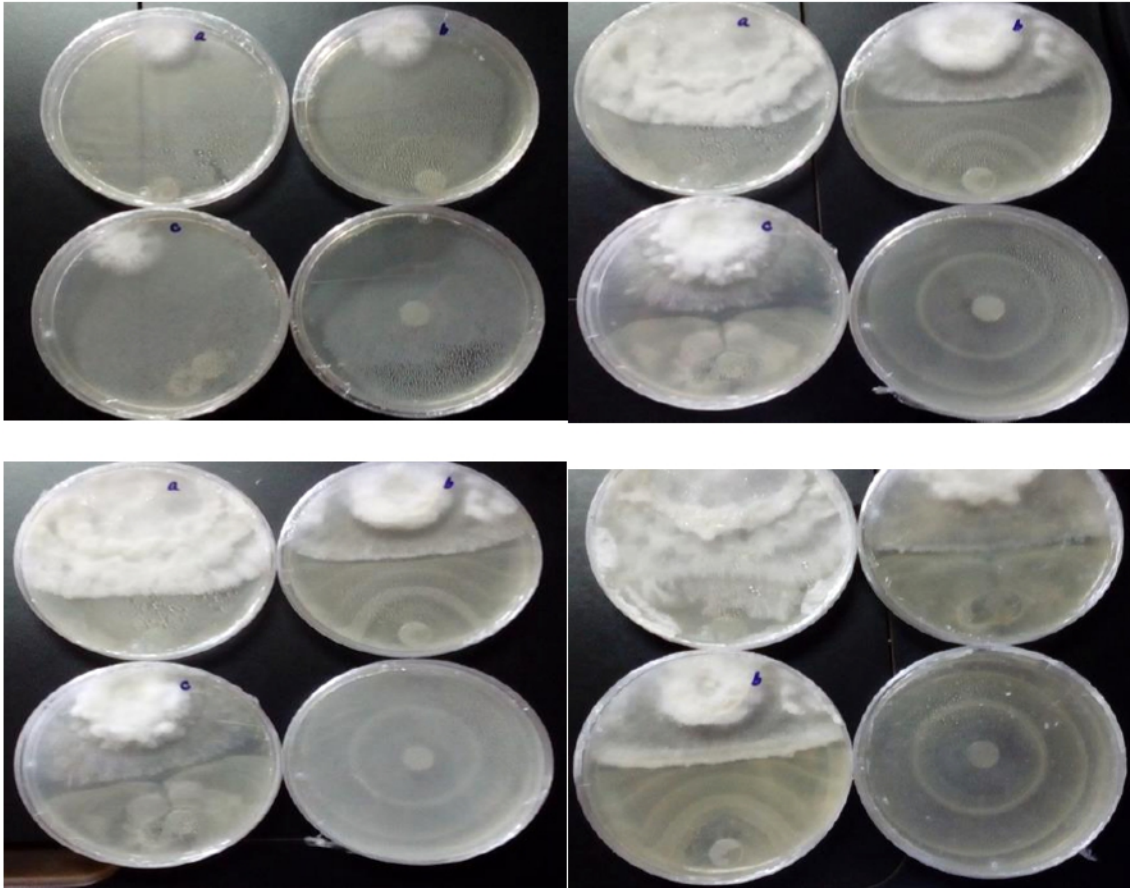


Figura N°18. Imágenes del enfrentamiento positivo entre Trf12 y *T.cucumeris*.